

*Clostridioides difficile* 630 $\Delta$ *erm in silico*  
und *in vivo*: Reannotation und quantitative  
metabolische Modellierung

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo Wilhelmina zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Henning Dannheim  
aus Braunschweig

1. Referent: Professor Dr. Dietmar Schomburg  
2. Referent: Professor Dr. Karsten Hiller  
eingereicht am: 29.03.2017  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 12.06.17

Druckjahr 2017

---

## Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Publikationen

**Henning Dannheim**, Thomas Riedel, Meina Neumann-Schaal, Boyke Bunk, Isabel Schober, Cathrin Spröer, Cynthia Maria Chibani, Sabine Gronow, Heiko Liesegang, Jörg Overmann, Dietmar Schomburg. „Manual curation and reannotation of the genomes of *Clostridium difficile* 630 $\Delta$ *erm* and *Clostridium difficile* 630“. *Journal of Medical Microbiology* 66.3 (2017), 286-293.

**Henning Dannheim**, Sabine Eva Will, Dietmar Schomburg, Meina Neumann-Schaal. „*Clostridioides difficile* 630 $\Delta$ *erm* in silico and in vivo - quantitative growth and extensive polysaccharide secretion“. *FEBS OpenBio* 7.4 (2017), 602-615.

Thomas Riedel, Daniela Wetzel, Julia Danielle Hofmann, Simon Paul Erich Otto Plorin, **Henning Dannheim**, Mareike Berges, Ortrud Zimmermann, Boyke Bunk, Isabel Schober, Cathrin Spröer, Heiko Liesegang, Dieter Jahn, Jörg Overmann, Uwe Groß, Meina Neumann-Schaal. „High metabolic versatility of different toxigenic and non-toxigenic *Clostridioides difficile* isolates.“ *International Journal of Medical Microbiology* (2017), doi:10.1016/j.ijmm.2017.05.007.



---

## Tagungsbeiträge

**Henning Dannheim**, Meina Neumann-Schaal, Dietmar Schomburg. „Metabolic modeling gives new insights into the metabolism of *Clostridium difficile*“ (Poster). 6th European Conference on Prokaryotic and Fungal Genomics (2015); Göttingen

Marcus Ulbrich, **Henning Dannheim**, Birte Fredrich, Helge Stark, Dietmar Schomburg. „Metabolic Models: To Understand and Redesign Cellular Wiring and Trade Flows“ (Poster). BRICS Opening Symposium (2016); Braunschweig

---

## Abstract

*Clostridioides difficile* causes antibiotic-associated infections of the colon with symptoms ranging from diarrhea to pseudomembranous colitis and sepsis. The virulence is mainly associated with the toxins, whose productions are tightly connected to the metabolism. Thus a contemporary high quality genome annotation as well a metabolic model are an important basis for the comprehension of the organism.

In this work, the genomes of the strains 630 and 630 $\Delta erm$  were manually reannotated. Therefore, either gene names, gene product names or assigned EC numbers for 57% of the genes were modified. In addition, completely new gene functions were proposed based on genomic analysis. The annotation of strain 630 $\Delta erm$  was used for the construction of the genome-scale metabolic model *i*HD992. Combined bioinformatical analyses and laboratory experiment led to the discovery of a previously unknown exopolysaccharide, whose structure and biosynthesis pathway could be postulated. Using dynamic flux balance analysis and including the production of the exopolysaccharide, quantitative and time-resolved simulations of growth and product formation were possible. In minimal medium, the polysaccharide secretion and growth are coupled, suggesting a connection to capsule and biofilm formation. Based on the production of organic acids *in silico* and *in vivo*, the importance of the Wood-Ljungdahl pathway, the propanoate fermentation pathway and the stoichiometry of the ATP-synthases are discussed.

*i*HD992 is the first model, which is capable to simulate quantitative growth and can therefore be used for the simulation of *in situ* behavior. The results of this work extend the comprehension of the organism, supporting projects in systems biology as well as the whole research on *C. difficile* and make new research projects possible.

---

## Kurzfassung

*Clostridioides difficile* verursacht Antibiotika-assoziierte Infektionen des Dickdarms, deren Symptome von Durchfall bis zu pseudomembranöser Kolitis und Sepsis reichen. Da die Virulenz hauptsächlich auf den Toxinen beruht, deren Produktion eng an den Metabolismus gekoppelt ist, stellen eine aktuelle und hochwertige Genomannotation sowie ein metabolisches Modell eine wichtige Grundlage für ein besseres Verständnis des Organismus dar.

Das Genom der Stämme 630 und 630 $\Delta_{erm}$  wurde im Zuge dieser Arbeit manuell reannotiert, wobei bei 57 % der Gene Genname, Produktname oder EC-Nummer geändert wurden. Außerdem wurden, basierend auf genomischen Analysen, vollständig neue Genfunktionen vorgeschlagen. Die Annotation des Stammes 630 $\Delta_{erm}$  wurde für die Erstellung des genomweiten metabolischen Modells *i*HD992 verwendet. Bioinformatische Analysen in Kombination mit Laborexperimenten führten zur Entdeckung eines zuvor unbekannten Exopolysaccharids, dessen Struktur und Biosyntheseweg postuliert werden konnte. Unter Einbeziehung der Exopolysaccharid-Produktion konnten mittels dynamischer Flussbilanzanalyse quantitative und zeitaufgelöste Simulationen des Wachstums und der Produktbildung durchgeführt werden. In Minimalmedium sind Wachstum und Sekretion des Polysaccharids gekoppelt. Dies legt eine Verbindung zur Kapsel- und Biofilmbildung nahe. Basierend auf der Produktion von organischen Säuren *in silico* und *in vivo* werden die Bedeutung des Wood-Ljungdahl-Wegs, der Fermentationsweg zu Propanoat und die Stöchiometrie der ATP-Synthasen diskutiert.

*i*HD992 ist das erste Modell, das quantitative Simulationen von *Clostridioides difficile* erlaubt und somit für *in situ*-Simulationen verwendet werden kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit erweitern das Verständnis des Organismus, wodurch systembiologische Projekte aber auch die gesamte Forschung an *C. difficile* profitieren und neue Forschungsansätze möglich werden.





# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Clostridioides difficile</i> . . . . .	1
1.1.1	Stamm 630 und seine Derivate . . . . .	2
1.1.2	Die Sporen von <i>Clostridioides difficile</i> . . . . .	2
1.1.3	Die Toxine von <i>Clostridioides difficile</i> . . . . .	3
1.2	Der Metabolismus von <i>Clostridioides difficile</i> . . . . .	5
1.2.1	Der Rnf-Komplex und Elektronen-Bifurkation . . . . .	5
1.2.2	Stickland-Reaktionen . . . . .	7
1.2.3	Wood-Ljungdahl-Weg . . . . .	9
1.2.4	Fermentation zu Butanoat . . . . .	11
1.3	Genomannotation . . . . .	12
1.4	Metabolische Modellierung . . . . .	14
1.4.1	Flussbilanzanalyse . . . . .	15
1.4.2	Flussvarianzanalyse . . . . .	16
1.4.3	Dynamische Flussbilanzanalyse . . . . .	16
1.5	Motivation und Ziele . . . . .	17
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1	Vorhersage von Genfunktionen . . . . .	18
2.2	Reannotation . . . . .	20
2.3	Modellerstellung . . . . .	20
2.4	Zusammensetzung der Biomasse . . . . .	22
2.5	Energiebedarf . . . . .	24
2.6	Datenanalyse für metabolische Modellierung . . . . .	24
2.7	(Zeitaufgelöste) Simulation des Metabolismus . . . . .	25

<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>27</b>
3.1	Reannotation von <i>Clostridioides difficile</i> . . . . .	27
3.1.1	Der unvollständige Tricarbonsäurezyklus . . . . .	28
3.1.2	Carboxylierung von 5-Aminophosphoribosylimidazol . . . . .	30
3.1.3	Lactatmetabolismus . . . . .	30
3.1.4	Abbau von 4-Hydroxyprolin . . . . .	33
3.1.5	Abbau von Histidin . . . . .	36
3.1.6	Essenzielle Aminosäuren . . . . .	37
3.1.7	Vitamin B12 . . . . .	39
3.1.8	Detoxifikation reaktiver Sauerstoffspezies . . . . .	40
3.1.9	Purinabbau in <i>Clostridioides difficile</i> . . . . .	41
3.1.10	Gallensäurenmetabolismus . . . . .	43
3.2	Modellierung von <i>Clostridioides difficile</i> . . . . .	45
3.2.1	Das Modell <i>iHD992</i> . . . . .	45
3.2.2	Das Modell <i>iMLTC806cdf</i> . . . . .	48
3.2.3	Vergleich zwischen <i>iHD992</i> und <i>iMLTC806cdf</i> . . . . .	48
3.2.4	Das Modell <i>icdf834</i> . . . . .	50
3.3	Antibiotika-Targets in <i>Clostridioides difficile</i> . . . . .	51
3.4	Produktion eines Exopolysaccharids . . . . .	52
3.4.1	Gluconeogenese trotz Glucoseaufnahme in MDM . . . . .	52
3.4.2	Produktion eines acetylierten Glucosepolymers . . . . .	53
3.5	<i>Clostridioides difficile</i> 630 $\Delta$ <i>erm</i> in MDM . . . . .	57
3.5.1	Wachstumsassoziierte Exopolysaccharidsekretion . . . . .	58
3.5.2	Die Aktivität der Glycolyse ist konstant . . . . .	59
3.5.3	Die Sekretion von Alanin . . . . .	63
3.6	<i>Clostridioides difficile</i> 630 $\Delta$ <i>erm</i> in CDMM . . . . .	64
3.6.1	Bildung von organischen Säuren . . . . .	64

3.7	Energie- und Redox-Metabolismus . . . . .	67
3.7.1	Die Rolle des Wood-Ljungdahl-Wegs . . . . .	67
3.7.2	Generierung von ATP . . . . .	71
3.7.3	Stöchiometrie der ATP-Synthase . . . . .	74
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>77</b>
<b>5</b>	<b>Danksagung</b>	<b>79</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>80</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>99</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>100</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>101</b>
<b>Anhang</b>		<b>A-1</b>
	Tabellen und Abbildungen . . . . .	A-1
	Modell <i>i</i> HD992 . . . . .	A-18
	Literaturverzeichnis . . . . .	A-50



# 1 Einleitung

## 1.1 *Clostridioides difficile*

*C. difficile* ist ein anaerobes, Gram-positives und Sporen-bildendes Bakterium aus der Ordnung der *Clostridiales*. Der Organismus ist häufig Verursacher von Durchfall in Folge von Antibiotika-Behandlungen in Deutschland und in den USA sogar öfter Verursacher nosokomialer Infektionen als *Staphylococcus aureus* [1, 2]. Die Symptome einer *C. difficile*-Infektion (CDI) reichen von leichtem Durchfall bis hin zu pseudomembranöser Kolitis, toxischem Megakolon, Perforation des Darmes und Sepsis [3]. 2012 gab es in Deutschland mindestens 83 Fälle von CDI pro 100.000 Einwohner. Die Mortalität im ersten Jahr betrug 13,5 % mit CDI als Hauptdiagnose und 24,3 % mit CDI als Nebendiagnose [4]. Die zusätzlichen Kosten für das deutsche Gesundheitssystem beliefen sich laut Grube *et al.* [5] auf 464 Millionen Euro für das Jahr 2011.

Der Erreger wurde zuerst von Hall und O'Toole [6] aus dem Mekonium von gesunden Neugeborenen isoliert und 1935 als *Bacillus difficile* beschrieben. Basierend auf phänotypischen Studien aus dem Jahr 1938 [7], erfolgte 1980 die Umbenennung in *Clostridium difficile* [8]. 1994 zeigte ein Vergleich der 16S-rRNA-Sequenzen fast aller Arten des damaligen Genus *Clostridium* dessen extreme Heterogenität [9]. In Folge wurde *C. difficile* in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology der Familie der *Peptostreptococcaceae* zugeordnet [10]. Daraufhin schlugen Yutin und Galperin [11] die Umbenennung in *Peptoclostridium difficile* vor. Im August 2016 gab es aufgrund deutlicher genomische Unterschiede innerhalb der vorgeschlagenen Gattung *Peptoclostridium* von Lawson *et al.* [12] den Gegenvorschlag, für *C. difficile* und nahe verwandte Spezies die Gattung *Clostridioides* zu schaffen und den Organismus in *Clostridioides difficile* umzubenennen. Auf diesem Wege könne man populäre Abkürzungen "*C. difficile*" und "*C. diff*" beibehalten und die weltweiten ökonomischen Auswirkungen der Umbenennung gering halten sowie Verwechslungen ausschließen [12]. Der Name *Clostridioides difficile* wurde kürzlich offiziell bestätigt [13].

### 1.1.1 Stamm 630 und seine Derivate

Der Modellstamm 630 wurde aus einem Krankenhauspatienten mit schwerer pseudomembranöser Kolitis in Zürich isoliert [14, 15]. 630 $\Delta erm$ , die Erythromycin-sensitive Variante des Stammes, wurde von Hussain *et al.* [16] durch spontane Mutation erzeugt. Bei diesem Stamm fehlt ein größerer Teil des Transposons Tn5398 inklusive eines der Erythromycin-Resistenzgene *ermB* [16]. Eine ähnlicher Stamm (630E) mit der gleichen Mutation, der ebenfalls ein Derivat von Stamm 630 ist, wurde kurze Zeit später auf ähnliche Weise erzeugt [17]. Beide Stämme können aufgrund ihrer Erythromycin-Sensitivität verwendet werden, um Insertionsmutanten zu erzeugen [17, 18]. Ein genauer Vergleich der beiden Stämme zeigte, dass Stamm 630 $\Delta erm$  phänotypisch (z. B. im Bezug auf Motilität, Toxizität und Virulenz) eine höhere Ähnlichkeit zum ursprünglichen Stamm aufweist, weshalb 630 $\Delta erm$  für genetische Studien empfohlen wurde [19].

Das Genom von *C. difficile* 630 wurde 2006 zum ersten Mal sequenziert [20] und mehrfach reannotiert [21, 22, diese Arbeit]. Die Resequenzierung und spätere Kuration des Stammes 630 (DSM 27543) mittels *short*- und *long-read*-Technologie zeigte eine Reihe von Unterschieden zur ersten Sequenzierung: Teilweise war das Transposon Tn5397 aus dem Chromosom geschnitten, ein zusätzlicher RNA-Cluster wurde detektiert und es konnte keine DNA des Plasmids gefunden werden [23, 24].

Eijk *et al.* [25] sequenzierten den Stamm 630 $\Delta erm$  und detektierten im Vergleich zum Stamm 630 neben des von Hussain *et al.* [16] berichteten Fehlens eines Erythromycin-Resistenzgens auch die Translokation des Transposons CTn5 sowie diverse Insertionen, Deletionen und Punktmutationen. Abgesehen von 3 Punktmutationen sowie 3 durch Regulation invertierten Regionen (eine davon mit weiteren Sequenzunterschieden) konnte die Sequenz später bestätigt werden [24].

### 1.1.2 Die Sporen von *Clostridioides difficile*

Als Reaktion auf Bedrohungen bildet *C. difficile* Endosporen [26, 27]. Diese sind resistenter gegen Desinfektionsmittel [27–29], Antibiotika [30], Sauerstoff [31], Hitze [32] und das Immunsystem des Wirts [33] als lebende Zellen. Wie auch in anderen Clostridia [34–36] wird in *C. difficile* die Sporulation durch Histidin-Kinasen initiiert und den Regulator Spo0A kontrolliert [37, 38]. Spo0A ist essentiell für die Sporulation

und somit auch für die Verbreitung von *C. difficile* [38, 39]. Außerdem ist ein Zusammenhang zwischen Spo0A und der Toxinproduktion in Diskussion [22, 38–41]. Die Auskeimung von Sporen ist ein wichtiger Schritt für die Infektion mit *C. difficile* [42]. Wilson [43] konnte schon früh zeigen, dass Gallensäuren die Auskeimung von *C. difficile*-Sporen fördern. Cholat, Glycocholat, Taurocholat und Deoxycholat stimulieren die Auskeimung von *C. difficile*-Sporen, wobei Deoxycholat auch das Wachstum inhibiert [43, 44]. Im Gegensatz dazu inhibieren Chenodeoxycholat und einige seine Analoga die Auskeimung von Sporen der meisten Isolate [45–47]. Für die Initiierung der Auskeimung durch Gallensäuren sind die Proteine CspA, CspB und CspC verantwortlich [48–51]. CspA reguliert die Menge an CspC in reifen Sporen [51]. CspC ist der Gallensäuren-Rezeptor und aktiviert CspB [49, 50], das dann proteolytisch die Sporen-Kortex-Hydrolase SleC aktiviert [48]. Neben Gallensäuren fördern aber auch diverse Aminosäuren (insbesondere Glycin, Cystein, Phenylalanin und Arginin) die Auskeimung von Sporen [44, 52].

### 1.1.3 Die Toxine von *Clostridioides difficile*

Stämme von *C. difficile* können die zwei Toxine A und B, die zur Familie der großen clostridialen Cytotoxine gehören, sowie ein binäres Toxin besitzen [53]. Letzteres besteht aus den beiden Proteinen CDTa und CDTb [54], die zusammen mit ihrem Regulator CdtR in der genomischen Region CdtLoc codieren [55].

Zwei Varianten von CdtLoc sind bekannt: Es kann wie in Stamm CD196 die komplette Region von 6,2 kb Länge vorliegen oder wie in Stamm 630 eine verkürzte Version, in der beide Gene des Toxins zerstört sind. Einige Stämme wie beispielsweise das nicht-toxigene Isolat CD37 haben stattdessen nur eine nicht-codierende Sequenz von 68 bp Länge [55]. Die Komponente CDTb ist am Import von CDTa in die Zelle beteiligt [56], welches Aktin ADP-ribosyliert und so dessen Polymerisation in der Zelle verhindert [57, 58]. Durch die Zerstörung des Aktin-Cytoskeletts entstehen Mikrotubuli-gefüllte Ausstülpungen der Zellmembran, die die Anlagerung von Bakterien fördern [59].

Obwohl Stämme mit binärem Toxin, aber ohne die Toxine A und B, virulent sein können [60], werden letztere als hauptsächliche Virulenzfaktoren betrachtet [61]. Beide Toxine bestehen aus vier Domänen, die durch das **ABCD**-Modell von Jank und Aktories [62] beschrieben werden.

**B** steht für Binden (engl. *binding*). Die Domäne befindet sich am C-Terminus und bindet an Kohlenhydrate auf der Oberfläche von Epithelzellen des Wirts [63].

**D** steht für Zustellen (engl. *delivery*). Nach der Endocytose des Toxins [64] sorgen vesikuläre  $H^+$ -ATPasen dann eine Absenkung des pH und so zu einer Konformationsänderung des Toxins [64, 65], wodurch hydrophobe Bereiche des Toxins exponiert werden [66]. Dies wiederum führt zu einer Insertion in die Vesikelmembran und zur Porenbildung [67, 68].

**C** steht für Schneiden (engl. *cutting*). Nach der Überführung der A- und C-Domänen in das Cytosol spaltet letztere autokatalytisch das Toxin und setzt die A-Domäne im Cytosol frei [69, 70].

**A** steht für Aktivität (engl. *activity*). Die Domäne hat eine Glycosyltransferase-Aktivität und glycosyliert mittels UDP-Glucose kleine GTPasen, die an der Regulation des Aktin-Cytoskeletts beteiligt sind, und führt so zu Apoptose der Wirtszellen [71–75].

Basierend auf Tierversuchen hielt man anfänglich Toxin A für das effizientere Toxin [76–79], später konnte allerdings gezeigt werden, dass Toxin B wahrscheinlich sogar die größere Bedeutung für die Infektion von Menschen hat [80, 81]. Savidge *et al.* [81] vermuteten daher, dass die Epithelzellen der getesteten Tiere nicht über den geeigneten Rezeptor für Toxin B verfügen.

Wenn vorhanden, codieren beide Toxine zusammen mit den drei Genen *tcdR*, *tcdE* und *tcdC* in dem 19,6 kb-großen Pathogenizitäts-Locus PaLoc [82]. TcdR ist ein alternativer RNA-Polymerase-Sigma-Faktor, der die Synthese der Toxine reguliert [83]. Das Holin-ähnliche TcdE, von dem mindestens zwei Isoformen existieren, ist für eine effiziente Sekretion der Toxine A und B notwendig [84]. TcdC reguliert ebenfalls die Toxinexpression, wobei dessen genaue Funktion derzeit unklar ist und debattiert wird [85–89].

Die Produktion der Toxine A und B ist an den Metabolismus gekoppelt und stark abhängig vom Nährstoffangebot [90–93]. So konnte gezeigt werden, dass abhängig vom Medium die Zugabe von Glucose die Toxin-Produktion sowohl senken als auch steigern kann [90, 91]. Eine Verringerung der Produktion konnte bei Zugabe von Aminosäuren, insbesondere Cystein, beobachtet werden [91–95]. Außerdem werden Enzyme, die an der Fermentation zu Butanoat beteiligt sind, gemeinsam mit den Toxinen gebildet [92, 93]. Dies konnte auch auf regulatorischer Ebene gezeigt werden: So wurden metabolische Regulatoren wie CcpA [96] und CodY [97, 98] identifiziert,



die Einfluss auf die Expression der Toxin-Gene haben. Diese Regulatoren kontrollieren außerdem die Aktivität der Prolin-Reduktion sowie der Butanoat-Fermentation [96, 98], weshalb ein Zusammenhang zwischen dem NADH- zu NAD<sup>+</sup>-Verhältnis und der Toxin-Produktion vermutet wird [99]. Diese Verbindungen zwischen Metabolismus und Virulenz zeigt den großen Bedarf, den Metabolismus von *C. difficile* besser zu verstehen.

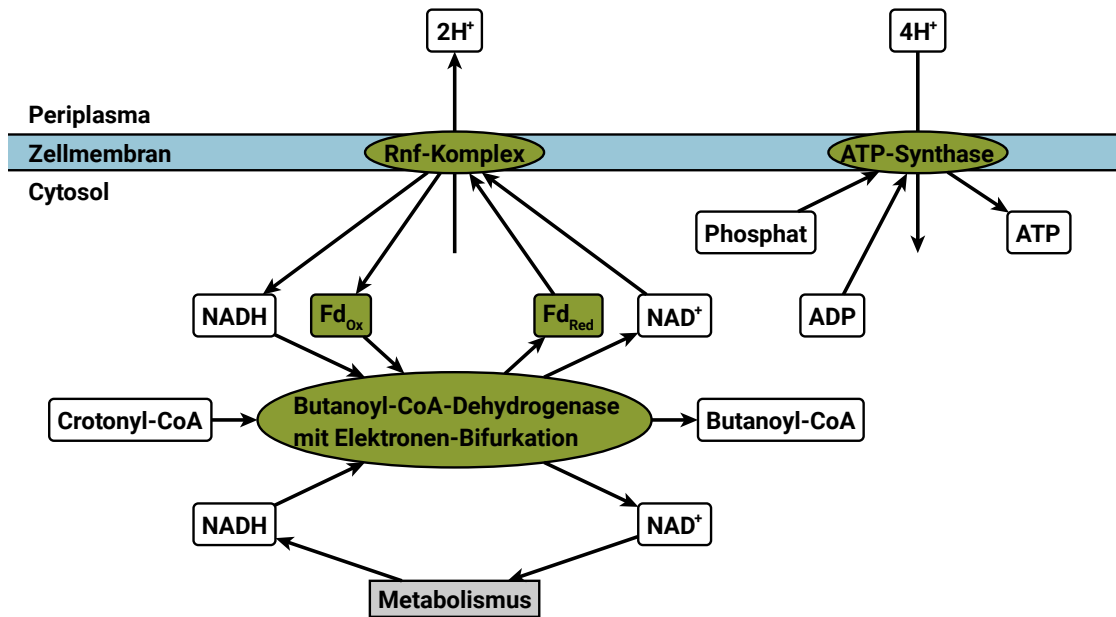
## 1.2 Der Metabolismus von *Clostridioides difficile*

*C. difficile* benötigt ein Medium aus sieben Aminosäuren sowie Glucose und konsumiert diese Substrate in komplexer Abfolge [91, 100–102]. Dass *C. difficile* keine Atmungskette besitzt, führt zu zwei gravierenden Nachteilen für den Organismus: Zum einen wird der üblicherweise durch die Atmungskette generierte Protonengradient nicht erzeugt, sodass die ATP-Synthase weniger ADP zu ATP phosphoryliert. Zum anderen müssen bei Oxidationen reduzierte Cofaktoren wie NADH anderweitig reduziert werden. Letzteres geschieht durch fermentative Wege wie beispielsweise die reduktiven Stickland-Wege, den Wood-Ljungdahl-Weg oder die Fermentation zu Butanoat (Kapitel 1.2.2 bis 1.2.4). Diese Wege setzen die Substrate nicht komplett zu CO<sub>2</sub> um, wobei weniger ADP zu ATP phosphoryliert wird und diverse organische Säuren produziert werden [102–104]. ATP wird in *C. difficile* über die omnipräsente Substratkettenphosphorylierung oder ATP-Synthasen generiert, wobei letztere über einen H<sup>+</sup>- oder Na<sup>+</sup>-Gradienten betrieben werden, der durch den Rnf-Komplex (Kapitel 1.2.1) erzeugt wird [105].

### 1.2.1 Der Rnf-Komplex und Elektronen-Bifurkation

Der Rnf-Komplex ist ein membrangebundener Enzymkomplex, der die Differenz der Elektrodenpotentiale von Ferredoxin und NAD<sup>+</sup> ausnutzt, um parallel zur Reduktion von NAD<sup>+</sup> mit Ferredoxin Ionen in Richtung des Gradienten durch die Membran zu transportieren (Abbildung 1.1) [106, 107]. Seinen Namen hat der Komplex aus historischen Gründen: Er wurde zuerst in *Rhodobacter capsulatus* identifiziert und ist dort an der Fixierung von Stickstoff beteiligt, weshalb die entsprechenden Gene das Präfix *rnf* (engl. *Rhodobacter nitrogen fixation*) erhielten [106]. Die Art der vom Rnf-Komplex transportierten Ionen ist abhängig von Organismus. So transportiert der

Komplex von *Acetobacterium woodii*  $\text{Na}^+$ -Ionen [107, 108], wohingegen bei *Clostridium ljungdahlii* [109] und *Clostridium autoethanogenum* [110] Protonen transportiert werden. Die dadurch aufgebauten Gradienten können verwendet werden um ATP-Synthasen zu betreiben und so ADP zu ATP zu phosphorylieren (Abbildung 1.1).



**Abbildung 1.1: Der Rnf-Komplex und Elektronen-Bifurkation.** Die Richtung der Pfeile zeigt die übliche Flussrichtung an. Blau: Zellmembran; grün: Proteine; weiß: Metabolite; grau: Stoffwechselwege; Fd<sub>Ox</sub>: oxidiertes Ferredoxin; Fd<sub>Red</sub>: reduziertes Ferredoxin.

Das für den Rnf-Komplex notwendige reduzierte Ferredoxin kann einerseits durch Ferredoxin-abhängige Dehydrogenasen (EC 1.2.7.-), wie sie in oxidativen Abbauwegen (z. B. oxidativen Stickland-Wegen, siehe Kapitel 1.2.2) auftreten, oder durch Elektronen-Bifurkation bereitgestellt werden. Hierbei wird die Reduktion eines Substrates, meist ein Derivat des Coenzym A (CoA), durch NADH an die Reduktion von Ferredoxin mit NADH gekoppelt [111]. So beträgt beispielsweise das Redoxpotenzial eines Enoyl-CoA etwa 0 mV und die Potentiale von NAD<sup>+</sup> und Ferredoxin liegen mit -280 mV bzw. -500 mV deutlich darunter [105]. Durch die Kopplung beider Reaktionen wird die Reduktion des Ferredoxins mit NADH möglich [105, 111]. Abbildung 1.1 zeigt beispielhaft das Zusammenwirken des Rnf-Komplex, der ATP-Synthase und der Butanoyl-CoA-Dehydrogenase.

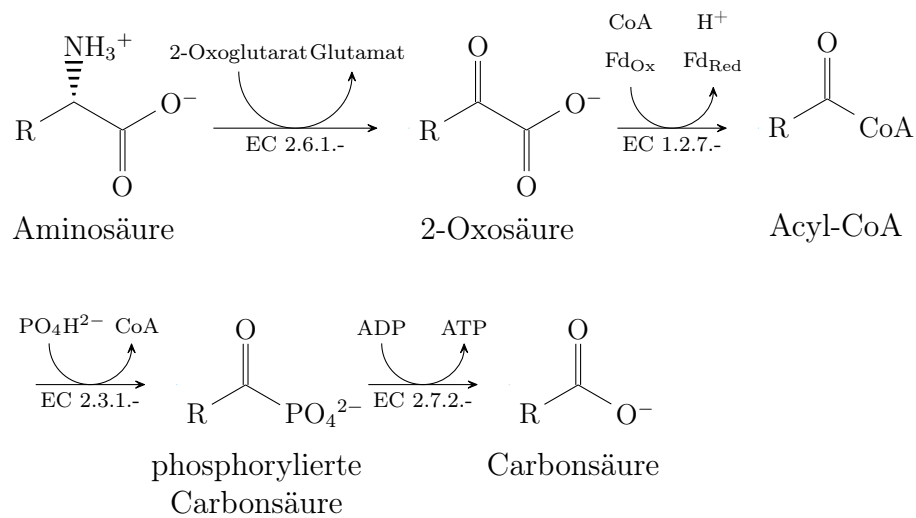
### 1.2.2 Stickland-Reaktionen

Bei einer Stickland-Gärung handelt es sich um die parallele Vergärung zweier Aminosäuren, bei der eine reduziert wird um die andere zu oxidieren [112, 113]. Schon kurz nach ihrer Erstbeschreibung Mitte der 30er des letzten Jahrhunderts durch L. H. Stickland [114–116] wurde diese Gruppe von Stoffwechselwegen nach ihrem Entdecker benannt [112, 117].

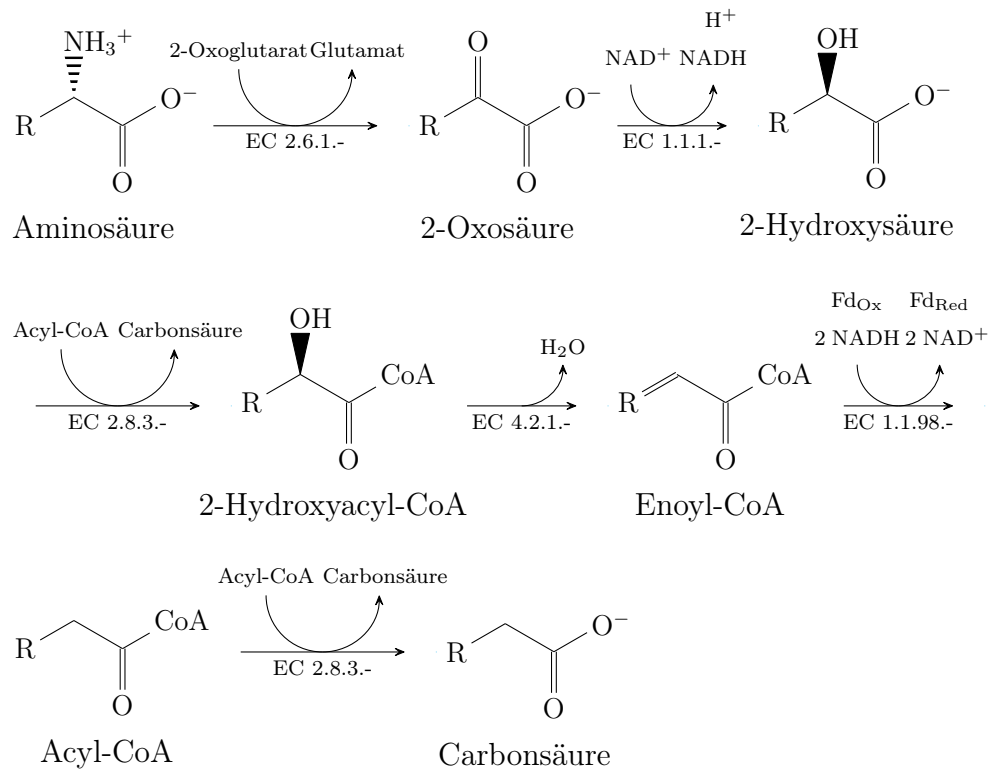
Es existiert eine Reihe von exotischen Stickland-Wegen, wie beispielsweise die Reduktion von Prolin [115, 118, 119] und Glycin [116, 120, 121] sowie die Degradation von Arginin über Ornithin [122–124]. Der Großteil der Stickland-Wege folgt allerdings dem gleichen Schema: Im ersten Schritt wird Ammonium abgespalten um eine Oxo-Säure zu erhalten. Dies geschieht in Clostridien üblicherweise durch Transaminierung mit 2-Oxoglutarat (EC 2.6.1.-) [113, 125, 126], kann aber auch direkt mittels Ammoniak-Lyasen (EC 4.3.1.-) wie bei Serin und Threonin [127] oder Kohlenstoff-Schwefel-Lyasen (EC 4.4.1.-) wie bei Methionin und Cystein [128, 129] geschehen. Die Transaminierung hat den Nachteil, dass das 2-Oxoglutarat mittels der Glutamat-Dehydrogenase (EC 1.4.1.2) aus Glutamat regeneriert werden muss, wobei  $\text{NAD}^+$  zu NADH reduziert wird.

Bei oxidativen Strickland-Wegen (Abbildung 1.2) folgt als zweiter Schritt die Reduktion mit Ferredoxin unter paralleler Erzeugung von CoA-Thioestern und  $\text{CO}_2$  [130–133]. Abschließend wird parallel zur Abspaltung des CoA ADP zu ATP phosphoryliert. Dies kann sowohl über die phosphorylierte Carbonsäure (siehe Abbildung 1.2) oder direkt mittels einer Säure-Thiol-Ligase (EC 6.2.1.-) geschehen [113, 134–137].

Geht man davon aus, dass die ATP-Synthase (EC 3.6.3.14) 4 Protonen entgegen des Gradienten pumpt um ein ATP zu phosphorylieren (vgl. Kapitel 3.7.3), reduziert der Oxidative Stickland-Weg (Abbildung 1.2) 2  $\text{NAD}^+$  zu NADH und phosphoryliert 1,5 ADP zu ATP. Da *C. difficile* nicht über eine Atmungskette verfügt, müssen alternative terminale Elektronenakzeptoren verwendet werden. Eine Möglichkeit sind klassische reduktive Stickland-Wege (Abbildung 1.3). Auch hier werden (meist durch Transaminierung) die Aminosäuren in Oxosäuren umgewandelt, dann folgt allerdings eine Reduktion mit NADH zu einer 2-Hydroxysäure (EC 1.1.1.-) [138–140], die Übertragung einer CoA-Gruppe durch eine Transferase (EC 2.8.3.-) [140] und eine Dehydratisierung (EC 4.2.1.-) zu Enoyl-CoA [141–143]. Während der Reduktion zum Acyl-CoA kommt es zur Elektronen-Bifurkation, wobei zwei NADH das Enoyl-



**Abbildung 1.2: Klassischer oxidativer Stickland-Weg.**  $\text{Fd}_{\text{Ox}}$ : oxidiertes Ferredoxin;  $\text{Fd}_{\text{Red}}$ : reduziertes Ferredoxin; R: Alkylrest.



**Abbildung 1.3: Klassischer reduktiver Stickland-Weg.**  $\text{Fd}_{\text{Ox}}$ : oxidiertes Ferredoxin;  $\text{Fd}_{\text{Red}}$ : reduziertes Ferredoxin; R: Alkylrest.

CoA und ein Ferredoxin reduzieren (siehe Kapitel 1.2.1) [111]. Der letzte Schritt ist die Übertragung der CoA-Gruppe, wobei die 2-Hydroxysäure vom Anfang des Stoffwechselwegs verwendet werden kann [140].

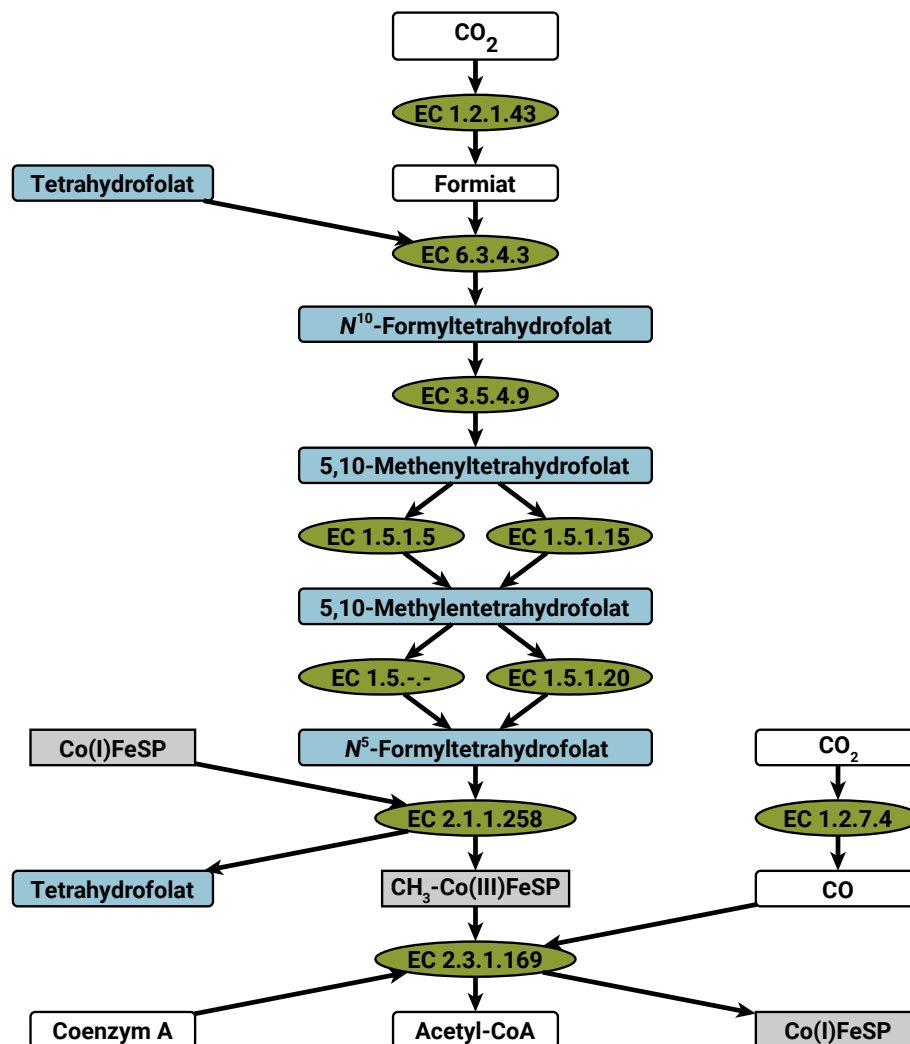
Homolog zum reduktiven Stickland-Weg verläuft auch die fermentative Reduktion von Pyruvat zu Propanoat, die in *Clostridium propionicum* charakterisiert wurde [138, 144–149]. Mit einer voranstehenden Transaminierung ist dieser Weg der reduktive Stickland-Weg von Alanin, das Pyruvat kann aber beispielsweise auch aus dem Abbau von Kohlenhydraten wie Glucose über die Glycolyse stammen.

In Summe führt ein reduktiver Stickland-Weg zu der Reduktion von einem NADH sowie der Bildung von 0,5 ATP (ATP-Synthase: 4 Protonen pro ATP). Für Leucin als Substrat liegt eine ausgeglichene Redoxbilanz bei der Reduktion von zwei Mol Leucin pro oxidiertem Mol Leucin vor [104, 142, 150]. In diesem Fall würden pro Aminosäure etwa 0,83 ATP produziert werden.

### 1.2.3 Wood-Ljungdahl-Weg

Neben den reduktiven Stickland-Wegen bietet auch der Wood-Ljungdahl-Weg die Möglichkeit NADH zu oxidieren. In diesem Weg, der auch als reduktiver Acetyl-CoA-Weg bekannt ist, werden zwei CO<sub>2</sub> als terminale Elektronenakzeptoren verwendet und zu Acetat reduziert (Abbildung 1.4). Er ist nach Harland Wood und Lars Ljungdahl benannt, die große Beiträge zum Verständnis der Kohlenstofffixierung in Anaerobiern beigetragen haben [151].

Der erste Schritt dieses Stoffwechselwegs in *Moorella thermoacetica* ist die Reduktion von CO<sub>2</sub> zu Formiat mittels NADPH (EC 1.2.1.43) [152, 153]. Im nächsten Schritt überträgt die ATP-abhängige Formiat-Tetrahydrofolat-Ligase (EC 6.3.4.3) das Formiat auf ein Tetrahydrofolat [154–157]. Die nächsten Schritte sind die Dehydratisierung durch die Methenyltetrahydrofolat-Cyclohydrolase (EC 3.5.4.9) sowie die Reduktion durch eine Methyltetrahydrofolat-Dehydrogenase (EC 1.5.1.5 oder 1.5.1.15) [158–160]. Anschließend wird das 5,10-Methyltetrahydrofolat zu N<sup>5</sup>-Methyltetrahydrofolat reduziert, wobei in *A. woodii* NADH (EC 1.5.1.20) der Elektronenakzeptor ist [161]. Für den Komplex von *M. thermoacetica* gibt es hingegen Hinweise für einen Mechanismus mit Elektronen-Bifurkation (EC 1.5.-.-) [162]. Köpke *et al.* [163] schlugen für *C. ljungdahlii* eine Reaktion mit Elektronen-Bifurkation vor, die mit zwei NADH ein 5,10-Methyltetrahydrofolat und ein Ferredoxin

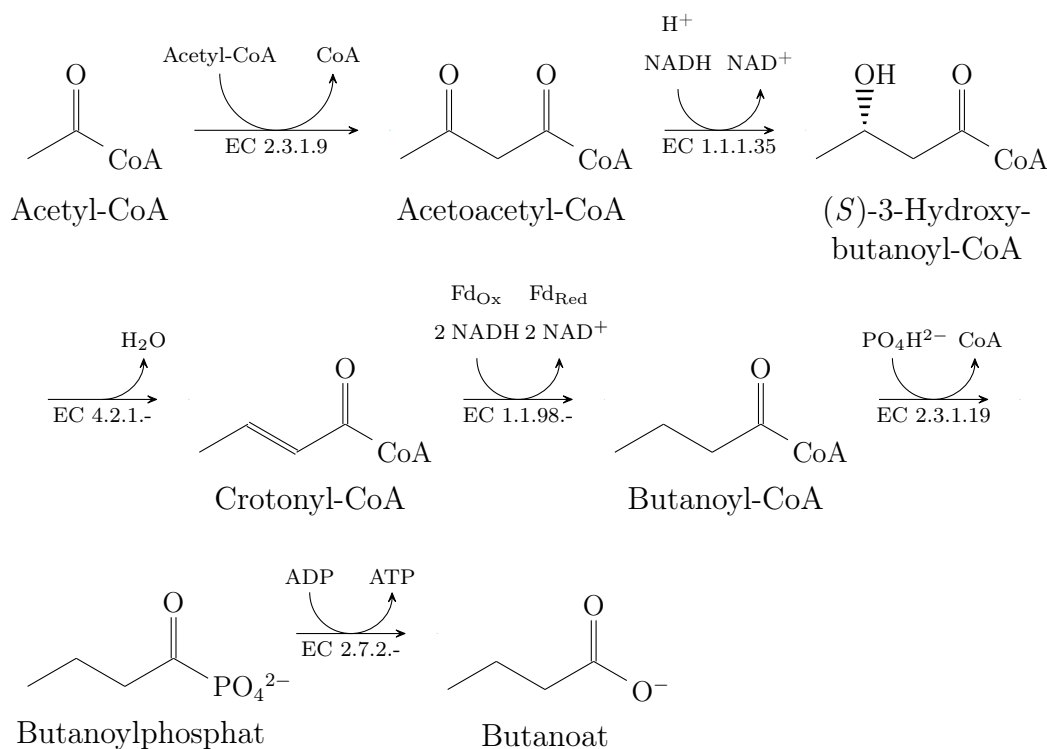


**Abbildung 1.4: Der Wood-Ljungdahl-Weg.** Zur Vereinfachung werden nicht alle Substrate und Produkte gezeigt. Die Richtung der Pfeile zeigt die übliche Flussrichtung an. Blau: Folat-Derivate; weiß: andere Metabolite; grau: Proteine; grün: Reaktionen.

reduziert. Dies wurde auch für metabolische Modelle von *C. ljungdahlii* [164] und *C. autoethanogenum* [110] übernommen. Der nächste Schritt ist die Übertragung der Methyl-Gruppe auf ein Corrinoide-Protein (EC 2.1.1.258) [165, 166]. Das letzte Enzym des Weges ist der Acetyl-CoA-Synthase-Komplex, der CO<sub>2</sub> zu CO reduziert (EC 1.2.7.4) und mittels methyliertem Corrinoide-Protein, CO und CoA Acetyl-CoA synthetisiert (EC 2.3.1.169) [166–169].

### 1.2.4 Fermentation zu Butanoat

Als eine weitere Möglichkeit für *C. difficile* Elektronen terminal zu übertragen ist die Fermentation zu Butanoat aus zwei Molekülen Acetyl-CoA (Abbildung 1.5) zu erwähnen, insbesondere da dieser Weg und die Produktion von Butanoat mit der Bildung des Toxins assoziiert wird [92, 93, 102].



**Abbildung 1.5: Fermentation zu Butanoat.** Fd<sub>Ox</sub>: oxidiertes Ferredoxin; Fd<sub>Red</sub>: reduziertes Ferredoxin.

Der Weg beginnt mit der Kondensation von zwei Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA und CoA durch die Acetyl-CoA-C-Acetyltransferase (EC 2.3.1.19) [170–174]. Der nächste Schritte sie die Reduktion zu (*S*)-3-Hydroxybutanoyl-CoA, wobei bei *C. difficile* und den meisten Clostridien NADH (EC 1.1.1.35) als Reduktionsmittel dient [172, 175–179], sowie die Dehydratisierung zu Crotonyl-CoA [178–181]. Danach folgt die zweite Reduktion durch die Butyryl-CoA-Dehydrogenase, die mittels Elektronen-Bifurkation parallel Crotonyl-CoA und Ferredoxin reduziert und dabei zwei NADH oxidiert [178, 179, 182]. In den letzten beiden Schritten wird zuerst das CoA durch

Phosphat ersetzt (EC 2.3.1.19) und dann damit ein ADP phosphoryliert (EC 2.7.2.7) [134–136].

Nimmt man an, dass organische Säuren protoniert sekretiert werden und die ATP-Synthase 4 Protonen pro ATP benötigt (vgl. Kapitel 1.2.2 und 3.7.3), führt die Bildung von Acetat aus Acetyl-CoA und dessen Sekretion zu 1,25 ATP. Bei der Fermentation von 2 Acetyl-CoA zu Butanoat und dessen Sekretion werden hingegen 1,75 ADP zu ATP phosphoryliert und 2 NADH zu NAD<sup>+</sup> oxidiert.

### 1.3 Genomannotation

Mit dem Aufkommen und der stetigen Weiterentwicklung von Sequenzierungsmethoden der nächsten Generation (engl. *next-generation sequencing*) sanken Kosten und Aufwand für qualitativ hochwertige Genomsequenzierungen [183]. Bei der dadurch deutlich steigenden Anzahl an neu sequenzierten Genomen, auch von *C. difficile* [20, 23, 25, 184, 185], kann entsprechend nicht mehr jedes Genom vollständig manuell annotiert werden [186, 187]. Eine aktuelle Annotation ist allerdings notwendig um einen Organismus, beispielsweise mittels Methoden der Systembiologie, zu verstehen. Über die Jahre wurden eine große Anzahl an Tools wie RAST [188], PGAP [189] und Prokka [190] entwickelt um komplette Genome automatisch zu annotieren. Im Folgenden soll am Beispiel Prokka [190] erklärt werden wie diese Programme im Allgemeinen funktionieren:

Zuerst werden Protein-codierende Sequenzen, RNAs und DNA-Features identifiziert. Hierfür verwendet Prokka Prodigal [191], RNAmmer [192], ARAGORN [193], SignalP [194] und Infernal [195].

Im zweiten Schritt werden den Protein-codierenden Sequenzen Funktionen zugewiesen. Hierbei verwendet Prokka ein 5-schrittiges hierarchisches System, das auf Homologie zu Sequenzen bekannter Funktion beruht. Es wird mit der vertrauenswürdigsten Quelle begonnen und wenn kein Treffer mit einem *e*-value von weniger als 10<sup>-6</sup> (Standardwert) gefunden werden kann, wird zur nächsten Quelle gewechselt. Die 5 Schritte sind:

1. BLASTp [196] mit einer vom Benutzer vorgegebenen Sequenzdatenbank.
2. BLASTp [196] mit allen bakteriellen Proteinen aus UniProt [197], die auf Protein- oder Transkriptomebene detektiert werden konnten.



3. BLASTp [196] mit allen in RefSeq [198] vorhandenen fertigen bakteriellen Genomen eines von Benutzer festgelegten Genus.
4. HMMER 3.1 [199], um Datenbanken mit Hidden Markov Modellen von Proteinsequenz-Profilen wie Pfam [200] zu durchsuchen.
5. Benennung als hypothetisches Protein.

Die vollständige automatische Annotation eines Genoms hat diverse Nachteile gegenüber einer Annotation durch einen Spezialisten. Viele davon sind vom verwendeten Annotationsprogramm abhängig. Beispielsweise detektiert Prokka bei der Festlegung der Gengrenzen weder Selenocysteine noch ribosomale Leserasterverschiebungen. Außerdem fehlen diverse Muster- und Pattern-basierte Datenbanken wie HAMAP [201] oder BrEPS [202]. Im Allgemeinen sind automatische Annotationstools besonders anfällig gegen inkonsistente Annotationen, wie sie durch Fusion/Teilung von Genen, die Verwendung von Synonymen oder Rechtschreibfehler entstehen [187].

Viele dieser Probleme bei der Zuweisung der Genfunktion umgeht der EnzymeDetector [203, 204], da hier EC-Nummern als einziges Annotationsmerkmal dienen. Außerdem werden diverse Annotationen vereinigt und Annotationsvarianten mittels eines Scoring-Systems verglichen. In diesen Eigenschaften liegt aber auch die Schwäche des EnzymeDetectors: Da EC-Nummern die Basis bilden, können nur Enzyme mit vollständigen EC-Nummern zuverlässig annotiert werden. Als Quellen dienen neben den üblichen Annotationswerkzeugen BLASTp [196] (mit SwissProt [197] als Datenbank), Pfam [200] und BrEPS [202] auch komplette Genomannotationen aus GenBank [205], KEGG [206] und PATRIC [207]. Diese kompletten Genomannotationen fehlen im Falle einer *de novo*-Annotation. Außerdem können sie stark veraltete Daten enthalten und geben keine Informationen zur Qualität der einzelnen Funktionsvorhersage. Dies wiederum erschwert ein ausgewogenes Scoring, wodurch eine gute vollautomatische Annotation kaum möglich ist.

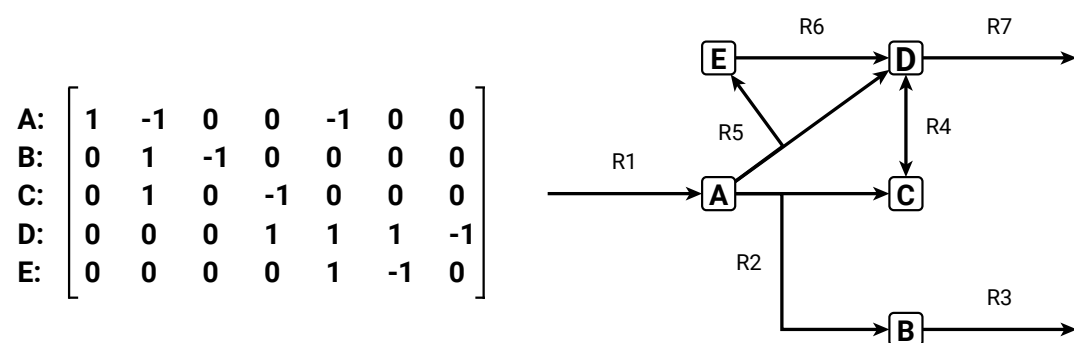
Das größte Problem aller automatischen Annotationstools ist tatsächlich, dass sie sich selbstständig zwischen diversen Möglichkeiten entscheiden müssen. Ein Spezialist kann, zumindest derzeit, besser die verschiedenen Quellen gegeneinander abwägen, die ihm gegebenen Informationen interpretieren und sogar neuartige Proteinfunktionen vorhersagen. Wie aber kann das Problem der immer größeren Anzahl an neuen Genomen umgangen werden? Richardson und Watson [187] schlugen hierfür vor, wenige bedeutende Genome möglichst hochwertig durch Spezialisten zu annotieren und stetig zu aktualisieren sowie mit diesem Gold-Standard die restlichen Genome

zu annotieren. Ein solcher Gold-Standard für die Annotation von *C. difficile* soll mit diese Arbeit bereitgestellt und dann als Basis für metabolische Simulationen verwendet werden.

## 1.4 Metabolische Modellierung

Metabolische Modelle können verwendet werden um den Metabolismus, an den bei *C. difficile* auch die Produktion der Toxine A und B gekoppelt ist [90–93], besser zu verstehen und so den Grundstein für neue Therapien zu legen. Diese Modelle können in drei Klassen aufsteigender Komplexität eingeteilt werden. Es gibt interaktionsbasierte Modelle, die Graphen-basiert das Netzwerk darstellen, einschränkungs-basierte Modelle, die die Stöchiometrie mit einbeziehen, und mechanistische Modelle, die zusätzlich die Kinetik beinhalten [208]. Da kinetische Daten nur in den seltensten Fällen zu Verfügung stehen, werden meist einschränkungs-basierte Modelle verwendet um den Metabolismus zu simulieren [209]. Diese metabolischen Modelle können für diverse Vorhersagen verwendet werden. Sie können helfen experimentelle Daten zu interpretieren, essenzielle Medienbestandteile vorherzusagen, qualitatives und quantitatives Wachstum von Wildtypen und Mutanten zu simulieren und sogar die Stöchiometrie von Protonentransporten zu bestimmen [210].

Stöchiometrische Modelle können mittels einer numerischen Matrix beschrieben werden, deren Spalten die Reaktionen und deren Zeilen die Metabolite darstellen (Abbildung 1.6).

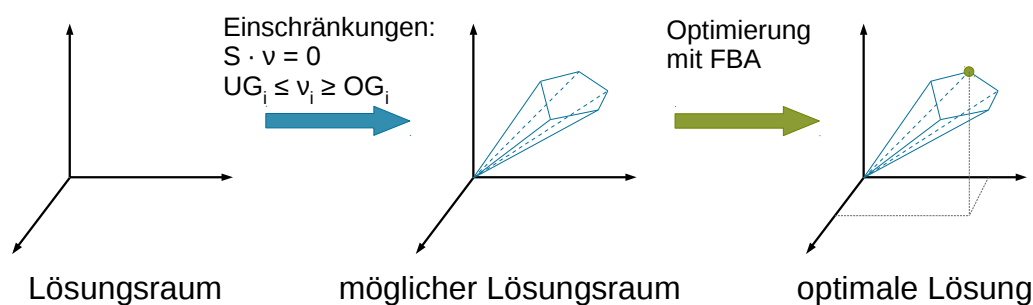


**Abbildung 1.6: Beispiel für ein einfaches stöchiometrisches Modell.** Links: Darstellung als Matrix; rechts: Darstellung als Hypergraph.

Bei einschränkungsbasierten Modellen wird von einem Fließgleichgewicht ausgegangen ( $S \cdot v = 0$ ). Dies bedeutet, dass die Summen der jeweils eingehenden und ausgehenden Flüsse durch jeden Knoten des Modells den gleichen Betrag haben müssen und sich somit die Konzentration der Metabolite nicht ändert [211]. Zusätzlich werden Beschränkungen durch Gleichungen, die Flüsse miteinander koppeln, oder Ungleichungen, die Flüsse begrenzen, definiert. Beispielsweise können experimentell bestimmte Substrataufnahmeraten als Grenze der Aufnahmeraten in das Modell integriert werden, sodass quantitative Simulationen möglich werden.

### 1.4.1 Flussbilanzanalyse

Einschränkungsbasierte Modelle beinhalten typischerweise mehr Reaktionen als Metabolite und sind daher unterbestimmt, wodurch es mehrere optimale Lösungen geben kann [212]. Die Flussbilanzanalyse (FBA) bietet eine Möglichkeit das Gleichungssystem zu lösen. Mit Einführung der Einschränkungen verkleinert sich der zuvor unendliche Lösungsraum (Abbildung 1.7). Nun kann die FBA mittels linearer Optimierung den Fluss durch eine Zielfunktion optimieren [213]. Bei der Beschreibung des mikrobiellen Wachstums hat sie die Optimierung hinsichtlich maximaler Produktion an Biotrockenmasse (BTM) als sinnvoll herausgestellt [214]. Das Ergebnis der FBA ergibt stets eine optimale Lösung, wobei zu beachten ist, dass es mehrere gleichwertige Lösungen geben kann [215]. Hierzu kommt es, wenn redundante Stoffwechselwege im metabolischen Netzwerken existieren.



**Abbildung 1.7: Funktionsweise der FBA.** S: stöchiometrische Matrix;  $v$ : Flussvektor;  $v_i$ : Flussvektor der Reaktion  $i$ ;  $UG_i$ : untere Grenze des Flusses  $i$ ;  $OG_i$ : obere Grenze des Flusses  $i$ .

### 1.4.2 Flussvarianzanalyse

Die Flussvarianzanalyse (FVA) wurde entwickelt um die Form des Lösungsraums analysieren zu können. Hierbei wird das Maximum und das Minimum eines Flusses unter der Einschränkung ermittelt, dass die Zielfunktion noch immer den optimalen Wert (optimale FVA) oder einen Wert nahe des Optimums (üblicherweise 95 %, suboptimale FVA) erreichen muss [216]. So lassen sich mittels optimaler FVA energetisch äquivalente redundante Wege (z. B. Aminierung mit L-Aspartat statt mit L-Glutamat) detektieren, während energetisch unterschiedliche redundante Wege (z. B. Oxidation mit  $\text{NAD}^+$  statt mit Ferredoxin) nur bei einer suboptimalen FVA aktiv sind.

Die Differenz zwischen Minimum und Maximum eines Flusses ist dessen Variabilität. Reaktionen, die bei einer optimalen FVA variabel sind, sind Teil eines Stoffwechselwegs zu dem es auch mindestens eine energetisch äquivalente Alternative gibt. Flüsse, die notwendig für die Zielfunktion (beispielsweise maximale Biomasseproduktion) sind, sind bei einer optimalen FVA im allgemeinen nicht variabel. Ausnahmen bilden hier Reaktionen, die sowohl notwendig für die Zielfunktion sind, als auch Teil eines redundanten Weges darstellen (siehe Kapitel 3.2.1). Außerdem gibt es Reaktionen, die nicht zur einer optimalen Lösung beitragen können und damit in der optimalen FVA stets einen Fluss von 0 mmol/(g<sub>BTM</sub> h) haben müssen.

### 1.4.3 Dynamische Flussbilanzanalyse

Die FBA ist gut dafür geeignet die statischen metabolischen Zustände während des Wachstums in einer konstanten Umgebung (z. B. in einem Chemostat) zu beschreiben [217]. Aufgrund der einfacheren Handhabung wird allerdings in den meisten Fällen eine Kultivierung im Batch- oder Fed-Batch-Verfahren durchgeführt, wodurch es über die Zeit zur Veränderung der Kultivierungsbedingungen kommt. Um diesen dynamischen Verlauf simulieren zu können wurde die dynamische Flussbilanzanalyse (DFBA) entwickelt, die aus mehreren FBAs besteht. Bei der DFBA werden Aufnahme- und/oder Produktionsraten zu jedem Zeitpunkt der Kultivierung benötigt, der simuliert werden soll, und jeweils eine FBA durchgeführt.

Für die Simulation des Wachstums mit nur einer Kohlenstoffquelle, beispielsweise für *Escherichia coli* auf Glucose [218, 219], können experimentell bestimmte maximale Aufnahmeraten verwendet werden. Ist die Substrataufnahme pro Biomasse nicht

konstant, müssen aus experimentell bestimmten Konzentrationsdaten durchgängige Konzentrationsverläufe gebildet werden um daraus die entsprechenden Raten für jeden Zeitpunkt zu berechnen. Um dies zu erreichen wurden bereits diverse Methoden wie der gleitende Mittelwert [220, 221], Spline-Interpolation [222] oder polynomielle Anpassungen [223] verwendet.

## 1.5 Motivation und Ziele

Die enge Verbindung zwischen Metabolismus und Virulenz von *C. difficile* zeigt, dass ein besseres Verständnis des Metabolismus für neue Therapien essentiell sein kann. Da der Phänotyp eines Organismus von seinem Genom ausgeht, ist die Betrachtung des Genoms eines Modell-Stamms naheliegend. Hierfür wurde der Stamm 630 $\Delta$ *erm* ausgewählt, da er eine hohe Ähnlichkeit zum *de facto* Standard-Stamm 630 besitzt und für Genominversionsmutanten geeignet ist [19]. Über eine komplette Reannotation des Genoms (Kapitel 3.1) sollte sowohl eine bessere Grundlage zur Auswertung moderner OMICS-Technologien gelegt als auch völlig neue Genfunktionen und Stoffwechselwege vorhergesagt werden.

Basierend auf dieser Annotation wurde ein metabolisches Modell erzeugt um erstmals quantitatives Wachstum und Produktbildung von *C. difficile* zu simulieren (Kapitel 3.2). Dies war nur möglich unter Einbeziehung der Produktion eines vorher unbekannten Polysaccharids, dessen Struktur auf Basis des Genoms vorgeschlagen wurde (Kapitel 3.4). Über Analyse von DFBA-Ergebnissen konnten weitere Erkenntnisse über Regulation und gesamt-metabolische Funktion von Stoffwechselwegen wie der Bildung organischer Säuren (Kapitel 3.6.1) oder Teilen des Energiemetabolismus (Kapitel 3.7) gewonnen werden.

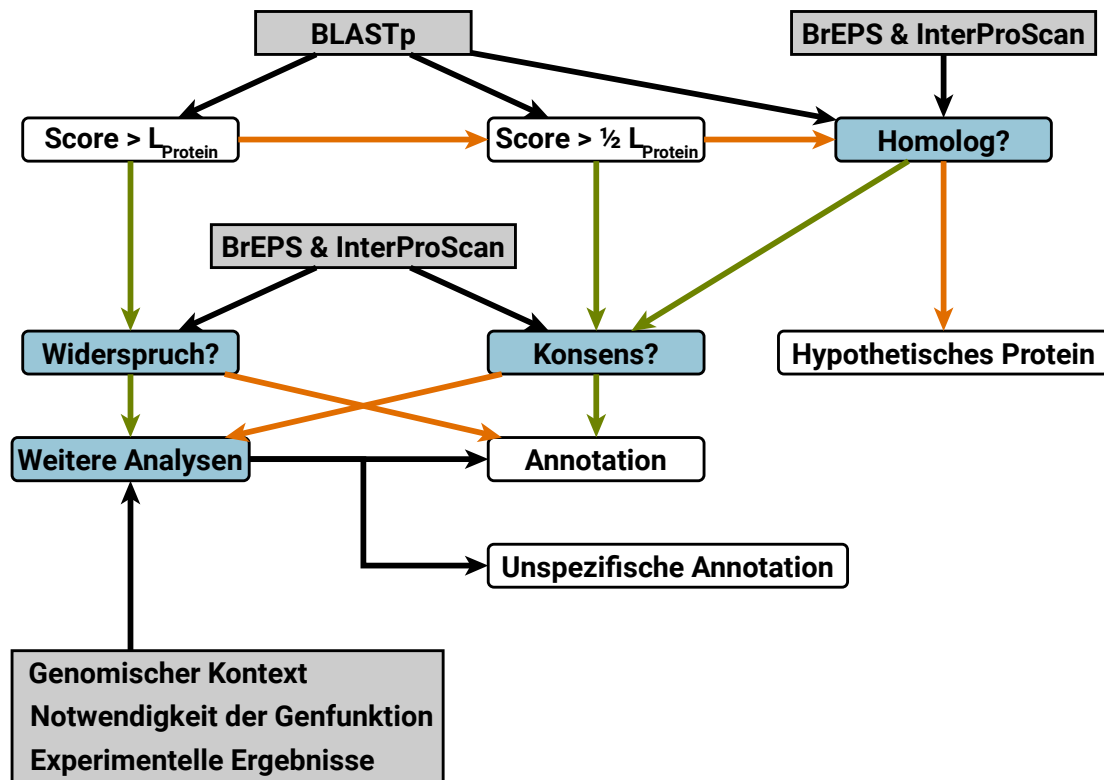
## 2 Material und Methoden

*C. difficile* 630 (DSM27543) und 630 $\Delta_{erm}$  (DSM28645) wurden vom Leibnitz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig und der Abteilung für Genomische und Angewandte Mikrobiologie (Universität Göttingen) sequenziert. Die Assemblierung, Kuration der Sequenzen und automatische Annotation mit Prokka [190] wurden von Thomas Riedel (Leibnitz-Institut DSMZ) durchgeführt [23, 24]. Die Annotation wurde zudem in Kooperation mit Boyke Bunk und Isabel Schober (Leibnitz-Institut DSMZ) auf die neuen Sequenzen der Stämme 630 und 630 $\Delta_{erm}$  übertragen und bei NCBI GenBank eingereicht. Abgesehen von den Experimenten, die zur Sequenzierung notwendig waren, wurden sämtliche Laborexperimente sowie Auswertung der Rohdaten von Meina Neumann-Schaal, Julia Hofmann und Sabine Will (alle Arbeitsgruppe Prof. Dietmar Schomburg) durchgeführt.

### 2.1 Vorhersage von Genfunktionen

Die codierenden Sequenzen des Stammes 630 [20, 21] wurden mit BLASTp [196] analysiert. Als Datenbank hierfür wurden alle SwissProt-Einträge genutzt, zu deren Produkten es einen experimentellen Nachweis auf Proteinebene gibt. Alternativ wurde BLASTp mit Sequenzen aus der Literatur und den vorhergesagten Proteinsequenzen des Zielorganismus als Datenbank verwendet. Des Weiteren wurden BrEPS [202] und InterProScan [224], das diverse Datenbanken in sich vereint, für Funktionsvorhersagen basierend auf Sequenzmustern und Hidden-Markov-Modellen eingesetzt. Der genomische Kontext eines Gens in unterschiedlichen Organismen wurde mit SyntTax [225] analysiert. Das genaue Vorgehen ist in Abbildung 2.1 gezeigt.

Für die Annotation wurden im Allgemeinen erst die BLASTp-Ergebnisse betrachtet. Da der E-value von der Datenbankgröße abhängt und unterschiedliche Datenbanken verwendet wurden (siehe oben), wurde primär der Score betrachtet. Als Faustregel wurde ein Hit mit einem Score, dessen Wert mindestens Länge des Proteins, dessen Funktion vorhergesagt werden soll, entspricht, als verwandtes Protein gleicher oder zumindest sehr ähnlicher Funktion betrachtet. Widersprachen die Ergebnisse von BrEPS und InterProScan dem nicht, wurde diese Annotation übernommen.



**Abbildung 2.1: Vorgehen bei der Vorhersage der Genfunktion.** Kriterien mit manueller Entscheidungsfindung sind blau markiert.  $L_{\text{Protein}}$ : Länge des Proteins, dessen Funktion vorhergesagt werden soll; oranger Pfeil: falsch; grüner Pfeil: wahr.

Bei einem BLASTp-Score von mindestens einem Wert entsprechend Hälfte der Länge des Proteins, wurde von einem Protein ähnlicher Funktion ausgegangen. Hierbei wurde versucht mittels BrEPS und InterProScan genauere Rückschlüssen zur Funktion ziehen zu können.

Wurden mit BLASTp keine ähnlichen Proteine in den Datenbanken gefunden, waren bei BrEPS und InterProScan ebenfalls meist nur unspezifische Ergebnisse vorhanden. Lieferte keine der Quellen eine Information zum entsprechenden Gen, wurde ein hypothetisches Protein annotiert. Alternativ wurde der genomische Kontext betrachtet, da Gene eines Operons meist gemeinsam eine Funktion erfüllen (z. B. Histidin-Biosynthese). „Fehlte“ entsprechend eine Genfunktion eines notwendigen bzw. als aktiv in *C. difficile* bekannten Stoffwechselwegs, wurde, besonders in genomischer Nähe der dazugehörigen Gene, eine Zuweisung der gesuchten Funktion mit weniger strengen Kriterien zugelassen.

Legte die Sequenz eines Proteins sowie dessen genomischer Kontext eine bisher unbeschriebene Funktion nahe, deren Existenz in *C. difficile* aufgrund experimenteller Ergebnisse plausibel ist, wurde diese vorgeschlagen (vgl. Kapitel 3.1.4 und 3.1.8 bis 3.1.10). Konnte auch unter Einbeziehung weiterer Daten keine Annotation mit ausreichender Sicherheit vorgenommen werden, wurde eine unspezifische Funktion annotiert und die Annotation als “putativ” gekennzeichnet (z. B. CD630\_04520: *putative hydrolase, NUDIX family*).

## 2.2 Reannotation

Als Grundlage für die Reannotation der Stämme 630 und 630 $\Delta_{erm}$  wurde die aktuellste manuelle Annotation (Pettit *et al.* [22], Genbank AM180355.1), basierend auf der Sequenzierung von Sebahia *et al.* [20], des Stammes 630 verwendet. Produktnamen, Gennamen oder EC-Nummern wurden angepasst falls das Ergebnis der Genfunktionsvorhersage nicht mit der publizierten Vorhersage übereinstimmte. Begründungen für signifikante Änderungen wurden in den Genbank-Datei vermerkt. Die Annotation wurde auf die neue Sequenz (GenBank CP016318.1) von Stamm 630 $\Delta_{erm}$  mittels Prokka 1.8 [190] übertragen. Die Einträge in „notes“ und „inferences“ wurden anhand der manuell korrigierten Orthologenvorhersage übertragen. Die programmierte ribosomale Leserasterverschiebung von *larC* und die Ausnahmen in der Translation durch den Einbau von Selenocystein, basierend auf Annotationen des Stammes 630 [21, 22] und automatischen Vorhersagen durch Prokka [190], wurden manuell hinzugefügt. Die Funktionen von zusätzlichen Genen wurden mit den zuvor beschriebenen Methoden vorhergesagt. Die Annotation des Stammes 630 $\Delta_{erm}$  wurde mit Hilfe der Locus-Tag-Nummern auch auf die aktualisierte Wildtypsequenz (GenBank CP010905.2) übertragen.

## 2.3 Modellerstellung

Für die Erstellung des einschränkungsbasierten metabolischen Modells *iHD992* wurden die in der Annotation des Stammes 630 $\Delta_{erm}$  enthaltenen EC-Nummern verwendet um mittels des hauseigenen Programms Simia (Rex [226], weiterentwickelt von Helge Stark) die entsprechenden Reaktionen aus *BKM-react* [227] zu exportieren



und in das Metano-Format [228] zu konvertieren. Die Datenbank *BKM-react* ist anderen Reaktionsdatenbanken überlegen, da sie die Reaktionen von mehreren Datenbanken (BRENDA [229], KEGG [206] und MetaCyc [230]) in nicht-redundanter Weise vereint [227]. Das Metano-Format wurde gewählt, da es im Gegensatz zum weiter verbreiteten und flexibleren SBML-Format [231] aus einfachem ASCII-Text besteht, der von Menschen leicht zu verstehen und bearbeiten ist [228].

Metabolisch redundante oder energetisch unmögliche Reaktionen und Reaktionskombinationen wurden ausgeschlossen. So wurde beispielsweise die reversible Reduktion von Acetaldehyd zu Ethanol mit NADPH nicht in das Modell aufgenommen, da Alkohol-Dehydrogenase (EC 1.1.1.1) im allgemeinen NADH verwenden und es sonst zu einem metabolischen Zyklus käme, der NADP<sup>+</sup> mit NADH reduzieren könnte. Dies ist unter physiologischen Bedingungen nicht möglich ist, da das Redoxpotential von NADP<sup>+</sup> in der Zelle niedriger ist als das von NAD<sup>+</sup> (siehe Tabelle 2.1).

**Tabelle 2.1: Redoxpotentiale von Cofaktoren.** Werte übernommen von Buckel und Thauer [105]. E°: Redoxpotential bei Standard-Bedingungen; E': Redoxpotential bei physiologischen Bedingungen.

Reaktion	E° [mV]	E' [mV]
Ferredoxin + e <sup>-</sup> = Ferredoxin <sup>-</sup>	-400	-500
Ferredoxin <sup>-</sup> + e <sup>-</sup> = Ferredoxin <sup>2-</sup>	-400	-500
NAD <sup>+</sup> + 2 e <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> = NADH	-320	-280
NADP <sup>+</sup> + 2 e <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> = NADPH	-320	-380

Außerdem wurden Reaktionen ausgeschlossen, die nicht zur Annotation passten, aber durch unspezifisch definierte EC-Nummern vorgeschlagen wurden, wie beispielsweise die Reduktion von 1-Naphthaldehyd durch die Alkohol-Dehydrogenase, die in *C. difficile* reicht eindeutig als Ethanol-Dehydrogenase zu identifizieren ist. Reaktionen mit Metaboliten, die nicht aus *C. difficile* oder verwandten Organismen bekannt sind, wie beispielsweise die Phosphorylierung von 5-Fluorouridin, wurden ebenfalls ausgeschlossen.

Außerdem wurde die Reaktionsliste manuell um nicht in der *BKM-react* enthaltene Reaktionen erweitert, wodurch ein Großteil der Stickland-Reaktionen hinzugefügt wurde. Transporter wurden eingefügt sofern sie im Genom annotiert, experimentell nachgewiesen oder strikt für das Modell notwendig waren. Zum Schluss wurden nicht-sequenzbasierte Reaktionen hinzugefügt um Lücken im Modell zu schließen.

So wurde eine Glutamin-hydrolysierende CTP-Synthase (EC 6.3.4.2) hinzugefügt da diese strikt notwendig für die Synthese von CTP ist und *C. difficile* nicht CTP-auxotroph ist.

### 2.4 Zusammensetzung der Biomasse

Die Menge an Protein, DNA, RNA und Lipiden in der BTM wurde experimentell ermittelt (Tabelle 2.2). Der Bedarf an Nukleotiden für rRNA und tRNA wurde anhand der entsprechenden Gensequenzen berechnet, wobei davon ausgegangen wurde, dass alle tRNAs im gleichen Verhältnis vorliegen. Die Anteile der Nucleotide in DNA und mRNA wurden anhand des GC-Gehalts des Chromosoms von *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* (GenBank CP016318.1 [24]) abgeschätzt. Die Massenanteile der verschiedenen RNAs wurden von Neidhardt *et al.* [232] für *E. coli* übernommen. 8000 Methylierungen der DNA pro Genom wurden basierend auf Literaturangaben [25] angenommen. Die Häufigkeit von RNA-Modifikationen stammen von möglichst verwandten Organismen (23S rRNA: *E. coli*, 16S rRNA: *Clostridium acetobutylicum*, tRNA: *Bacillus subtilis*) aus der Datenbank MODOMICS [233].

Außerdem wurden die relativen Anteile (gebunden und frei) der meisten Aminosäuren durch saure Hydrolyse der Zellen und anschließende Messungen mittels Flüssigkeitschromatographie und Fluoreszenzdetektion (LC/FLD) bestimmt (Tabelle A.3). Um den Anteil der für die Proteinbiosynthese relevanten Aminosäuren abschätzen zu können, wurden anhand der im Genom codierten Proteine eine Reihe von Annahmen getroffen: Erstens, die gemessene Menge Glutamat war ursprünglich Glutamat und Glutamin im Massenverhältnis 4:1. Zweitens, die gemessene Menge Aspartat war ursprünglich Aspartat und Asparagin im Massenverhältnis 1:1. Drittens, die Massenverhältnisse von Histidin, Cystein, Tryptophan und Selenocystein sind 100:80:80:1. Außerdem wurde vereinfachend angenommen, dass sämtliches *meso*-Diaminopimelat im Peptidoglycan gebunden ist. Die entsprechenden Mengen Glutamat, Alanin und Glycin wurden, gemäß der Zusammensetzung des Peptidoglycans in *C. difficile* 630 [237], abgezogen um die Aminosäurezusammensetzung der Proteine zu ermitteln. Basierend auf dem ermittelten Anteil von Protein in der BTM wurde der Bedarf aller Aminosäuren (inklusive *meso*-Diaminopimelat) berechnet und so indirekt auch der Anteil des Peptidoglycans an der BTM bestimmt (Tabelle A.3). Das Massenverhältnis

**Tabelle 2.2: Biomassenzusammensetzung von *C. difficile*.** Masseanteile der Biomasse im Modell *i*HD992 im Vergleich zu experimentellen und geschätzten Daten von *C. difficile*, *B. subtilis* [234], *S. aureus* [235] und *E. coli* [232].

Komponente	<i>i</i> HD992	<i>C. difficile</i> <sup>a</sup>	<i>B. subtilis</i> <sup>b</sup>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Protein	0,508	0,508 ± 0,014	0,5284	0,4	0,55
RNA	0,091	0,091 ± 0,001	0,0655	0,12	0,205
DNA	0,043	0,043 ± 0,002	0,0260	0,03	0,031
Lipid	0,060	0,084 ± 0,002	0,076	0,04291	0,091
Lipoteichonsäure	0,024		0,0304	0,02709	0,034
Peptidoglycan <sup>c</sup>	0,145		0,1009	0,1344	0,025
Polysaccharid II <sup>c</sup>	0,097		0,1234	0,1056	
Glycogen	0,005		0,0000		0,025
Ions	0,022		0,0321	0,0944	0,01
Metabolite	0,005		0,0173	0,0456	0,029
Summe	1,000	0,726	1,0000	1,0000	1,000

<sup>a</sup>: Ermittelt von Meina Neumann-Schaal

<sup>b</sup>: Verdünnungsrate 0,1 h<sup>-1</sup>

<sup>c</sup>: Verhältnis 2:3 in SDS-gereinigter Zellwand von Stamm NCTC 11223 [236]

des Peptidoglycans und des Polysaccharids II der Zellwand [238] wurde auf 4:6 [236] gesetzt.

Es wurde angenommen, dass die Lipoteichonsäure von *C. difficile* [239] Teil des quantifizierten Lipidpools ist und das Massenverhältnis zu den Phospholipiden wie in *B. subtilis* 8:20 beträgt [234]. Da nur Phosphatidylglycerol-Analoga in Isolaten von *C. difficile* gefunden wurden [240] und das Modell nur Biosynthesewege für Phosphatidylglycerol und Cardiolipin enthält, wurden diese beiden Lipide in einem molaren Verhältnis von 1:1 in die Biomassegleichung aufgenommen. Die durchschnittliche Länge einer Fettsäure (16,246 C) sowie der Anteil der ungesättigten Fettsäuren (16,4 %) wurden von Elsdén *et al.* [241] übernommen.

Der Anteil des Glycogens an der BTM wurde auf 0,5 % geschätzt. Zur Vereinfachung wurde der Metabolitpool nur aus Cofaktoren und anderen, für den Organismus notwendigen aber sonst nicht produzierten, Metaboliten aufgebaut. Die Verhältnisse der Metabolite wurden von *C. acetobutylicum* (Amador-Noguez *et al.* [242], säurebildende Phase) übernommen. Für zusätzliche Metabolite wurde die gleiche Konzentration wie bei FAD angenommen (siehe Tabelle A.8).

Da intermediäre Metabolite für die Zusammensetzung des Metabolit-Pools nicht beachtet wurden, musste der Anteil an Metaboliten an der BTM unterschätzt werden. Der Bedarf von Metaboliten und Ionen für die BTM wurde auf 0,5 % bzw. 2,2 % gesetzt. Für die Zusammensetzung des Ionen-Pools wurden die Werte von Dauner und Sauer [234] für *B. subtilis* übernommen und um die Ionen  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  (jeweils 1 %) erweitert. Eine exakte Aufstellung der Biomassezusammensetzung ist in den Tabellen A.1 bis A.8 zu finden.

## 2.5 Energiebedarf

Damit ein metabolisches Modell quantitatives Wachstum möglichst genau simulieren kann, müssen passende Werte für die nötige Energie zur Erhaltung des Organismus ermittelt werden. Die wachstumsassoziierte Erhaltungsenergie (*growth-associated maintenance energy*: GAM) und die nicht-wachstumsassoziierte Erhaltungsenergie (*non-growth-associated maintenance energy*: NGAM) werden klassischerweise basierend auf Kultivierung im Chemostat berechnet [243]. Da diese Art von Daten für *C. difficile* nicht vorlagen, wurde die NGAM abgeschätzt. Hierfür wurden das arithmetische Mittel des Glucosebedarfs von fünf anaeroben Darmbakterien [244] verwendet und einer Ausbeute von 3,3 ATP/Glucose bei einer gemischten Acetat/Butanoat-Gärung [105] angenommen. Da die GAM stark von den Substraten und der Biomassezusammensetzung abhängt, konnten hierbei keine Literaturdaten verwendet werden. Diverse Werte für die GAM zwischen 10 und 100 mmol/(g<sub>BTM</sub> h) wurden getestet und letztendlich der Wert auf 45 mmol/(g<sub>BTM</sub> h) gesetzt, weil hierbei die *in vivo*-ähnlichsten Ergebnisse für definiertes Minimalmedium (*minimal defined medium*: MDM) und *C. difficile* Minimalmedium (CDMM), das Casein-Hydrolysat und Glucose als C-Quellen enthält, erreicht werden konnten.

## 2.6 Datenanalyse für metabolische Modellierung

Als Grundlage für die Szenarien der metabolischen Simulationen dienten Daten zum Wachstum und zur Substrataufnahme. Die optische Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) sowie die relativen Substratkonzentrationen während der Kultivierung von *C. difficile* 630Δ*erm* in MDM und CDMM wurden der Literatur entnommen [102]. Mittels

der Software OriginPro 2015G (OriginLab, USA) wurden Funktionen an die Daten angepasst um eine stetige Beschreibung der Konzentrationen über die Zeit zu erhalten und die Daten zu glätten. Wenn notwendig, wurden mehrere Funktionen generiert, die dann jeweils nur einen bestimmten Bereich der Kultivierung abbilden. Die generierten Funktionen der OD<sub>600</sub> und Substratkonzentrationen für MDM und CDMM (Tabellen A.10 und A.11) wurden verwendet um die Konzentrationen im Abstand von 15 min (Start bei 7,5 min) in MDM und 10 min (Start bei 5 min) in CDMM festzulegen. Die relativen Substratkonzentrationen wurden in absolute Konzentrationen konvertiert, indem die Konzentration zum Zeitpunkt 0 h auf die Konzentration im ursprünglichen Medium gesetzt wurde. Die Biomasse wurde aus der OD<sub>600</sub> mittels der im Labor bestimmten Korrelation von 0,425 g/L BTM pro OD<sub>600</sub> berechnet.

## 2.7 (Zeitaufgelöste) Simulation des Metabolismus

Die hauseigene Metano Toolbox (Riemer [228], weiterentwickelt von Helge Stark) wurde verwendet um die physiologischen Zustände in *C. difficile* 630Δ*erm* mittels FBA und FVA zu analysieren. Bei der FVA wurde ein Fluss dann als variabel angesehen, wenn die Differenz des maximalen und des minimalen Flusses größer  $10^{-5}$  war. Die DFBA wurde mittels eines eigenen Python-Skriptes und Metano durchgeführt. Im Gegensatz zu früheren Implementierungen der DFBA [218, 219] wurden die Substrataufnahmeraten und die Bildung einiger Produkte zu jedem Zeitpunkt vorgegeben. Ähnlich der DFBA-Methode, die genutzt wurde um das Verhalten von *E. coli* während des Wechsels des limitierenden Substrats zu beschreiben [223], wurden die Raten für *C. difficile* aus den zuvor bestimmten Konzentrationsänderungen in jedem Zeitintervall (siehe oben) berechnet.

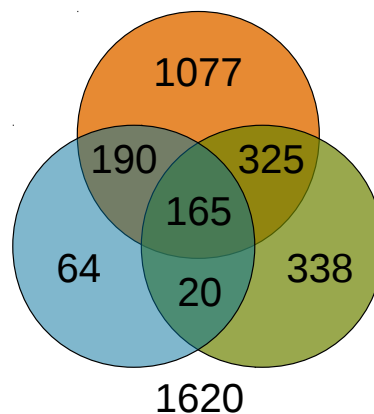
Für die Simulation der Biosynthese des Exopolysaccharids wurde UDP-Glucose als Substrat für die Polymerisation angenommen. Außerdem wurde eine Acetylierung jedes zweiten Zuckermonomers mit Acetyl-CoA und die Hydrolyse eines ATP als Transportkosten durch die Membran festgelegt. Die Fettsäurebiosynthese wurde auf Acetylphosphat als Startermolekül beschränkt um eine extensive Nutzung der metabolisch günstigeren Butanoat- und Stickland-Stoffwechselwege zu verhindern. Für die *in silico*-Reproduktion der experimentellen Wachstumsdaten in CDMM mittels DFBA mussten zwei Einschränkungen eingeführt werden: Erstens, die Methy-

lentetrahydrfolat-Dehydrogenase ( $\text{NADP}^+$ , EC 1.5.1.5) musste nach 2,5 h Wachstum deaktiviert werden um ein Auffüllen des Ein-Kohlenstoff-Metabolismus ausgehend von Formiat zu verhindern. Der Grund für die Deaktivierung des Stoffwechselweges *in vivo* ist unbekannt. Zweitens, die Bildung von Propanoat und Hexanoat musste begrenzt werden. Hierfür wurde der maximale Fluss der Acetyl-CoA-C-acetyltransferase mit Propanoyl-CoA als Substrat auf maximal  $1/3$  und mit Butanoyl-CoA als Substrat auf maximal  $1/20$  des Flusses mit Acetyl-CoA gesetzt.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Reannotation von *Clostridioides difficile*

Um eine möglichst hochwertige und aktuelle Annotation zu generieren, wurden die codierenden DNA-Sequenzen (CDS) der manuellen Annotation von *C. difficile* 630 aus dem Jahr 2014 [22] komplett manuell überarbeitet. Die vorhergesagte Funktion von 601 der 3799 codierenden Sequenzen wurden geändert. Die Annotation weiterer 1577 Loci wurde um Informationen wie beispielsweise eine zusätzliche EC-Nummer erweitert oder angepasst um der derzeitigen Nomenklatur gerecht zu werden (siehe Abbildung 3.1). Die Anzahl der (konservierten) hypothetischen Proteine wurde von 466 auf 314 gesenkt. Diese Annotation wurde als Vorlage für die Annotation der Resequenzierungen von 630 $\Delta$ *erm* (GenBank CP016318.1) verwendet.



**Abbildung 3.1: Reannotation von *C. difficile* 630.** Unterschiede zwischen der hier präsentierten Annotation und der Annotation durch Pettit *et al.* [22] von *C. difficile* 630 [20]. Orange: geänderter Produktname; blau: geänderter Genname; grün: geänderte EC-Nummer.

Die Reannotation des Stammes 630 $\Delta$ *erm* enthält 3782 CDS, von denen nur 289 hypothetische Proteine sind. Von den ursprünglichen CDS des Stamms 630 [21] sind 115 nicht in der Reannotation des Stamms 630 $\Delta$ *erm* vorhanden, wobei keines dieser Gene (außer dem erwarteter Weise fehlenden *ermB1* [16]) eine bisher bekannte Funktion besitzt. Im Vergleich zur Annotation von 2010 [21] wurden 90 zusätzliche Gene in *C. difficile* 630 entdeckt. Beispielsweise wurden Gene für einen Ni<sup>2+</sup>-Carrier (*larC*,

CDIF630erm\_00317), den Ribosomen-Bindungsfaktor A (*rbfA*, CDIF630erm\_01466) sowie ein putatives, Selenocystein-enhaltendes Protein eines Glycin/Sarcosin/Betain-Reduktase-Komplexes (CDIF630erm\_01932) gefunden. Die Reannotation führte zu einer Reihe von Erkenntnissen über den Metabolismus von *C. difficile*. So enthält das Genom orthologe Gene von zuvor in anderen Organismen charakterisierten Proteinen wie die *Re*-Citrat-Synthase (EC 2.3.3.3) [245] oder die Aspartat-Decarboxylase (EC 4.1.1.12) [246]. Außerdem flossen bisher nicht berücksichtigte Erkenntnisse zum Stoffwechsel von *C. difficile*, wie beispielsweise zum Pentose-Abbau [247] und zur post-translationalen Modifikation des Flagellins [248], in die Annotation ein.

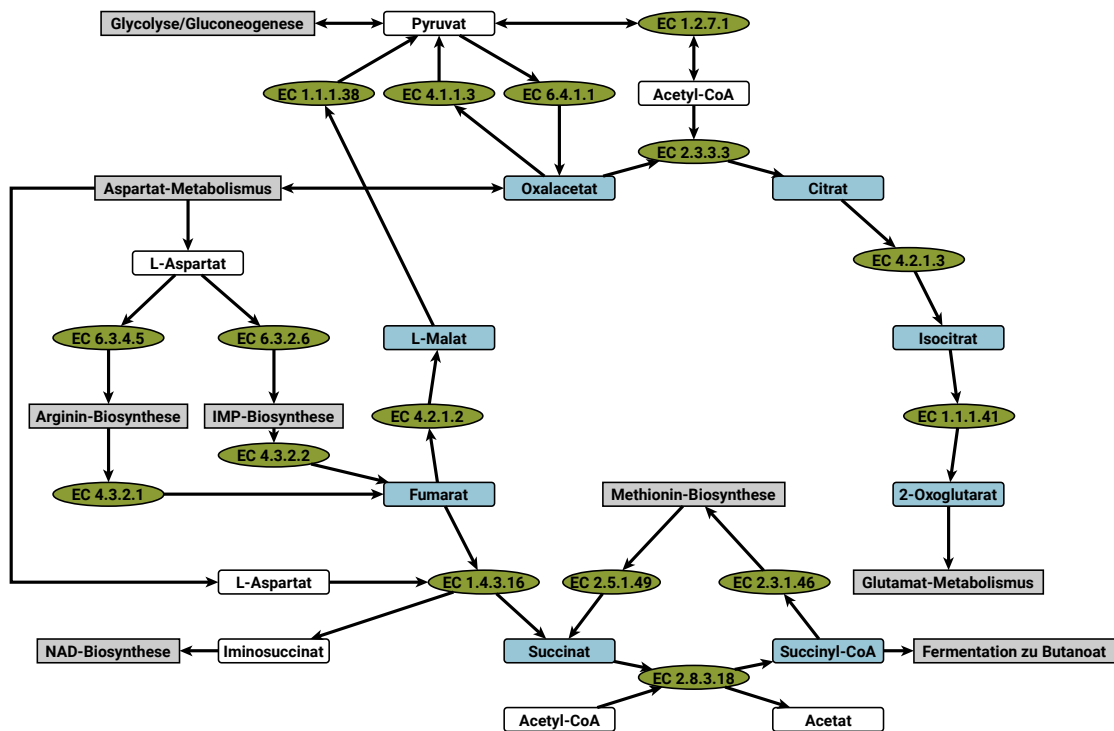
Ausgehend von der Annotation des Stammes 630 $\Delta$ *erm* wurde auch die korrigierte Sequenz (GenBank CP010905.2) der Resequenzierung [23] vom Stamm 630 reannotiert. Diese Annotation enthält 3771 CDS, von denen 3762 in beiden Stämmen vorkommen. Die meisten Unterschiede sind durch die Deletion der *erm*-Region [16] und das Fehlen der Tn5397-codierenden Sequenz im Stamm 630 zu erklären. Im Folgenden werden einige Ergebnisse der Reannotation von *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* näher vorgestellt und diskutiert, welche die wichtigsten Verbesserungen gegenüber der Annotation von Pettit *et al.* [22] darstellen.

#### 3.1.1 Der unvollständige Tricarbonsäurezyklus

Basierend auf der neuen Annotation von *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* besitzt der Organismus einen fragmentierten Tricarbonsäurezyklus (TCA-Zyklus). Dieser ist zwar nicht fähig eine an CoA gebundene Acetyl-Gruppe zu CO<sub>2</sub> zu oxidieren, kann aber dennoch alle notwendigen Metabolite für die Biomasseproduktion generieren und Nebenprodukte von Biosynthesen abbauen (Abbildung 3.2).

In der oxidativen Richtung des Zyklus ist der Biosyntheseweg von Pyruvat zu 2-Oxoglutarat, das für den Glutamat-Metabolismus notwendig ist, vollständig vorhanden. Hierbei ist zu erwähnen, dass für die Acetylierung des Oxalacetats nicht die übliche Citrat-(*Si*)-Synthase (EC 2.3.3.1), sondern homolog zu *Clostridium kluyveri* [245] eine Citrat-(*Re*)-Synthase (EC 2.3.3.3) vorhanden ist. Es besteht keine direkte Verbindung zwischen 2-Oxoglutarat und Succinyl-CoA. Die reduktive Richtung des TCA-Zyklus ist schon deutlich früher unterbrochen: Es wurde keine nicht-decarboxylierende L-Malat-Dehydrogenase wie beispielsweise EC 1.1.1.37 im Genom von *C. difficile* gefunden. Die restlichen Metabolite des TCA-Zyklus (L-Malat





**Abbildung 3.2: Der TCA-Zyklus von *C. difficile*.** Zur Vereinfachung werden nicht alle Substrate und Produkte gezeigt. Die Richtung der Pfeile zeigt die übliche Flussrichtung an. Blau: Metabolite des TCA-Zyklus; weiß: andere Metabolite; grün: Reaktionen; grau: Stoffwechselwege.

bis Succinyl-CoA) sind nichtsdestotrotz über L-Aspartat mit dem Metabolismus verbunden. L-Aspartat dient als Ammonium-Donor für die Biosynthesen von Arginin und IMP, wobei es in Fumarat umgewandelt wird. Fumarat kann mittels der Fumarat-Hydratase (EC 4.2.1.2) und der Oxalacetat-decarboxylierenden Malat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.38) zu Pyruvat abgebaut werden. Außerdem wird eine kleine Menge Fumarat als Elektronenakzeptor der Oxidation von L-Aspartat zu Iminosuccinat für die NAD-Biosynthese benötigt. Das entstehende Succinat wird dann mittels Succinyl-CoA:Acetat-CoA-Transferase (EC 2.8.3.18) an CoA gebunden. Succinyl-CoA kann entweder für die Methionin-Biosynthese verwendet werden, wo es wieder zu Succinat umgewandelt wird, oder zu Butanoat abgebaut werden.

Ein ähnlicher TCA-Zyklus wurde in 2014 für *C. acetobutylicum* beschrieben [249]. Der TCA-Zyklus beider Organismen unterscheidet sich auf Basis des Genoms, da in *C. acetobutylicum* kein Homolog zu bekannten Succinyl-CoA:Acetat-CoA-Transferase-

sen gefunden werden konnte. Außerdem besitzt *C. acetobutylicum* putative Gene für eine Malat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.37) und eine 2-Oxoglutarat-Synthase (EC 1.2.7.3) [249–251]. Experimente mit Isotopen-markierten Substraten und Flussmodellierung konnten allerdings unter den verwendeten Kultivierungsbedingungen aktives Recyclen von Succinat zu Succinyl-CoA aber keine Aktivität einer Malat-Dehydrogenase oder 2-Oxoglutarat-Synthase zeigen [249–251]. Diese Variante entspricht dem in *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* annotierten TCA-Zyklus.

#### 3.1.2 Carboxylierung von 5-Aminophosphoribosylimidazol

Für die Biosynthese von Inosinmonophosphat muss die 5-Aminoimidazol-Gruppe des Zwischenproduktes 5-Amino-1-(5-phospho- $\beta$ -D-ribosyl)imidazol an Position 4 carboxyliert werden. Frühere Annotationen von *C. difficile* 630 [20–23] und 630 $\Delta$ *erm* [25] wiesen das Produkt des Gens *purE* (CDIF630erm\_00340) als Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxylase (EC 4.1.1.21) aus, die auch die entsprechende Carboxylierung in tierischen Zellen durchführt [252]. Eine Analyse der Proteinsequenz mit InterProScan [224] zeigte allerdings, dass es wahrscheinlich eine 5-(Carboxyamino)imidazol-ribonucleotid-Mutase (EC 5.4.99.18) ist, wie für Prokaryoten typisch [253]. Dieses Enzym katalysiert die Isomerisierung von 5-Carboxyamino-1-(5-phospho-D-ribosyl)imidazol zu 5-Amino-1-(5-phospho-D-ribosyl)imidazol-4-carboxylat. Zuvor erfolgt die Carboxylierung in Bakterien üblicherweise mittels der 5-(Carboxyamino)imidazol-ribonucleotid-Synthase (EC 6.3.4.18) unter Hydrolyse von ATP [252, 253]. Ein entsprechendes Gen konnte nicht in *C. difficile* identifiziert werden, allerdings deuten phylogenetische Studien in Archaeen [254] sowie Experimente *in vitro* [255] und *in vivo* [256] darauf hin, dass eine 5-(Carboxyamino)imidazol-ribonucleotid-Mutase allein ausreichend sein kann.

#### 3.1.3 Lactatmetabolismus

Frühere Annotationen von *C. difficile* 630/630 $\Delta$ *erm* beinhalteten Gene für eine L-Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27, CDIF630erm\_02396) und eine D-Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.28, CDIF630erm\_00522) [22, 23, 25]. Kim *et al.* [140] konnten allerdings zeigen, dass das letztere Gen stattdessen für die (*R*)-Hydroxyiso-

caproat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.345) des reduktiven Stickland-Wegs von Leucin codiert.

Zusätzlich konnte nun eine D-Lactat-Dehydrogenase mit Elektronen-Bifurkation annotiert werden. Bei der hier vorliegenden Elektronen-Bifurkation ist die Oxidation von D-Lactat mit  $\text{NAD}^+$  an eine parallele Oxidation von Ferredoxin mit einem weiteren  $\text{NAD}^+$ -Molekül gekoppelt [257]. Im Gegensatz zu den gewöhnlichen Lactat-Dehydrogenasen, die unter physiologischen Bedingungen Pyruvat zu dem entsprechenden Lactat reduzieren, ist durch das niedrige Redoxpotential des Ferredoxins das Gleichgewicht zur Seite des Pyruvats verschoben, sodass sich die Reaktionsrichtung unter physiologischen Bedingungen im Vergleich zu den gewöhnlichen Lactat-Dehydrogenasen umkehrt [257]. Außer für die drei Proteine des Lactat-Dehydrogenase-Komplexes (katalytische Untereinheit und die Elektronentransportproteine EtfA und EtfB) codiert dieses Operon (siehe Tabelle 3.1) mit zuvor unbekannter Funktion in *C. difficile* auch für einen Transkriptionsregulator der GntR-Familie und eine Lactat-Racemase (EC 5.1.2.1).

**Tabelle 3.1: Gene des Lactatmetabolismus von *C. difficile* 630 $\Delta$ erm.** Siehe Tabelle A.12 für Details der Sequenzanalysen.

Genlocus	Funktion	EC-Nummer
CDIF630erm_00316	$\text{Ni}^{2+}$ -Ladeprotein LarB	3.6.1.8
CDIF630erm_00317	$\text{Ni}^{2+}$ -Carrierprotein LarC	
CDIF630erm_00921	Acetyl-CoA:Lactat-CoA-Transferase	2.8.3.-
CDIF630erm_00922	Acryloyl-CoA-Dehydrogenase	} 1.3.98.-
CDIF630erm_00923	Elektronentransportprotein EtfB	
CDIF630erm_00924	Elektronentransportprotein EtfA	
CDIF630erm_01317	Transkriptionsregulator, GntR-Familie	
CDIF630erm_01318	Lactat-Racemase	5.1.2.1
CDIF630erm_01319	Lactat-Dehydrogenase	} 1.1.98.-
CDIF630erm_01320	Elektronentransportprotein EtfA	
CDIF630erm_01321	Elektronentransportprotein EtfB	
CDIF630erm_01977	$\text{Ni}^{2+}$ -Übertragungsprotein LarE	
CDIF630erm_02396	L-lactat-Dehydrogenase	1.1.1.27

Erst kürzlich wurde die Lactat-Racemase aus *Lactobacillus plantarum* charakterisiert [258]. Homologe Gene für die akzessorischen Proteine LarB, LarC, und LarE konnten ebenfalls im Genom von *C. difficile* gefunden und annotiert werden (Tabelle 3.1).

In vorhergehenden Annotationen von *C. difficile* 630/630 $\Delta$ *erm* war *larC* entweder als Pseudogen eines hypothetischen Proteins, das durch eine Leserasterverschiebung zerstört wurde [20–22, 25], oder als zwei Gene hypothetischer Proteine [23] annotiert. Interessanterweise enthält auch *larC* von *L. plantarum* eine Leserasterverschiebung, Desguin *et al.* [258] konnten aber zeigen, dass das gesamte Protein im Gegensatz zum N-terminalen Fragment funktional ist und vermuteten daher eine programmierte ribosomale (-1)-Leserasterverschiebung. In der Tat würde eine (-1)-Leserasterverschiebung im Polyadenin-Bereich der *larC*1-Sequenzen von beiden Organismen zu kompletten Proteinen mit einer Sequenzidentität von 37 % führen (Abbildung 3.3). Hierbei würde auch der hoch-ähnliche Bereich I-x-A-N-[IL]-D-D in *C. difficile* wieder hergestellt, der zwischen beiden Fragmenten im Genom codiert. Es ist folglich anzunehmen, dass es sich bei *larC* in *C. difficile* um ein voll funktionstüchtiges Gen mit einer programmierten ribosomalen (-1)-Leserasterverschiebung handelt.

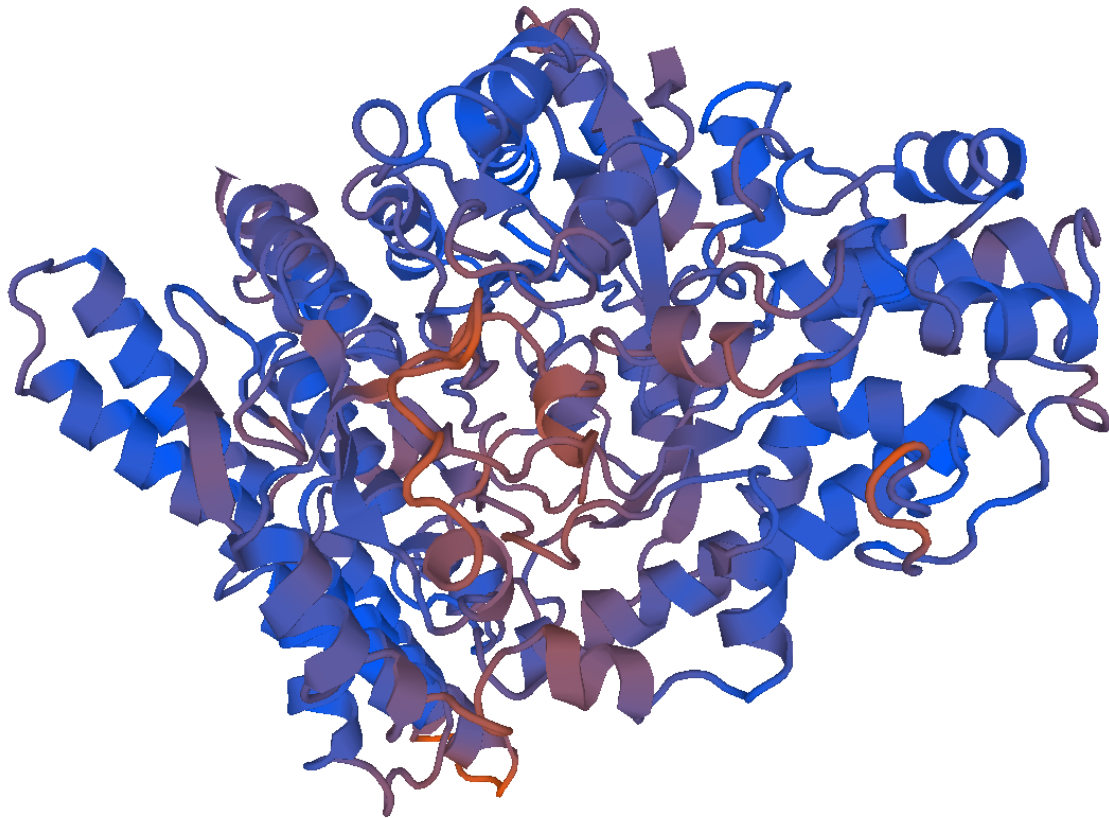
	PNILRTVLGEKKK-----KN	MSSEIYSYLYEKI	
<i>C. difficile</i>	PNILRTVLGEKKK-----EELIYEISANIDMSSEIYSYLYEKI		244
	* **:* **:	: : *.*:* :.* .*: :::	
<i>L. plantarum</i>	FNALRAVLFEKKKLSQQIVNRTADAVLMIEANLDDQTGEGLGYVMNQL		298
	FNALRAVLFEKKN	MIEANLDDQTGEGLGYVMNQL	

**Abbildung 3.3: *larC* (CDIF630*erm*\_00317) ist kein Pseudogen.** Multiples Alignment (Clustal Omega [259]) der vorhergesagten LarC-Sequenzen von *C. difficile* und *L. plantarum* im Bereich der Leserasterverschiebung. Grau: LarC-Fragmente; schwarz: Komplettes Protein durch programmierte ribosomale (-1)-Leserasterverschiebung.

Des Weiteren verfügt *C. difficile* über die notwendigen Gene um Lactat zu Propanoat zu reduzieren (Tabelle 3.1). Hierbei wird Lactat durch den Transfer einer CoA-Gruppe aktiviert und dann dehydratisiert. Für die folgende Reduktion sind die Gene für eine Acryloyl-CoA-Reduktase mit Elektronen-Bifurkation vorhanden, die entsprechende Aktivität des Komplexes *in vivo* wird allerdings bei den verwandten Organismen *C. propionicum* [138] und *Clostridium homopropionicum* [105] angezweifelt (siehe auch Kapitel 3.7.3).

### 3.1.4 Abbau von 4-Hydroxyprolin

Im Genom von *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* sind direkt nebeneinander eine Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktase (EC 1.5.1.2, CDIF630erm\_03581), ein Protein mit einer Sequenzidentität von 38 % zur von Raynaud *et al.* [260] charakterisierten B12-unabhängigen Glycerin-Dehydratase aus *Clostridium butyricum* (ATD26\_17630, CDIF630erm\_03582) sowie eine Aktivase für ein Glycylradical-Enzym (CDIF630erm\_03583) codiert. Basierend auf der 3D-Struktur der B12-unabhängigen Glycerin-Dehydratase von *C. butyricum* [261] wurde mittels SWISS-MODEL [262] ein Modell des Proteins von *C. difficile* erstellt (Abbildung 3.4).



**Abbildung 3.4:** Modell der putativen 4-Hydroxyprolin-Dehydratase von *C. difficile*. Das Modell wurde basierend auf der Struktur 1R9D der B12-unabhängigen Glycerin-Dehydratase von *C. butyricum* [261] mit Hilfe von SWISS-MODEL [262] erstellt. GMQE: 0,75; QMEAN: -2,28; orange: niedrige Modellqualität; blau: hohe Modellqualität.

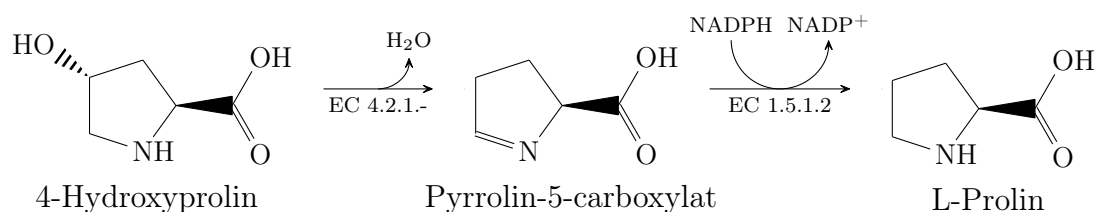
Laut dem von O'Brien *et al.* [261] vorgeschlagenen Mechanismus der Glycerin-Dehydratase sind die Aminosäurereste H164, H281, C433, E435, und G763 direkt an der Katalyse beteiligt. Bis auf H281, dessen Aufgabe möglicherweise die räumlich nahen W277 oder H160 übernehmen könnten, sind alle entsprechenden Positionen im Protein von *C. difficile* konserviert (Tabelle 3.2). Im Gegensatz dazu sind die Aminosäurepositionen der restlichen Substratbindetasche [261] nicht im Protein von *C. difficile* konserviert. Dies weist auf einen ähnlichen Reaktionsmechanismus aber auf ein anderes Substrat hin.

**Tabelle 3.2: Das Enzym von *C. difficile* ist keine Glycerin-Dehydratase.** Aminosäuren des aktiven Zentrums der B12-unabhängigen Glycerin-Dehydratase von *C. butyricum* [261] und ihre Entsprechungen laut Sequenzalignment mit SWISS-MODEL [262] in der putativen 4-Hydroxyprolin-Dehydratase von *C. difficile*. GD: Glycerin-Dehydratase; HPD: putative 4-Hydroxyproline-Dehydratase.

GD	HPD	Funktion in der Glycerin-Dehydratase [261]
H164	H160	Stabilisiert Übergangszustand der C2-OH-Gruppe
H281	D278	Stabilisierung der OH-Gruppe des C2
C433	C434	Radikalisierung des C2
E435	E436	Stabilisierung der OH-Gruppe des C1
G763	G765	Glycylradikal im Gleichgewicht mit C433
S282	A279	} Teil der Substratbindetasche
Y339	F340	
D447	L447	
Y640	L643	

Eine Dehydration von 4-Hydroxyprolin würde nach dem Vorbild der Glycerin-Dehydratase von *C. butyricum* (mittels Imin-Enamin-Tautomerie statt Keto-Enol-Tautomerie) zu (*S*)-1-Pyrrolin-5-carboxylat führen. Um zu testen ob 4-Hydroxyprolin als Substrat für das Protein von *C. difficile* in Frage kommt, wurde mit SwissDock [263] ein Docking mit dem zuvor in SWISS-MODEL [262] erstellten Modell des Proteins durchgeführt. Die Simulation zeigte, dass die Bindetasche eine ausreichende Größe für 4-Hydroxyprolin besitzt. Eine klare Ausrichtung des Moleküls am aktiven Zentrum konnte nicht bestimmt werden, was an der relativ geringen Modellqualität im inneren des Enzyms (siehe Abbildung 3.4) liegen könnte. Nach der Dehydration durch die putative 4-Hydroxyprolin-Dehydratase könnte dann die im

Genom direkt stromabwärts codierende Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktase das (*S*)-1-Pyrrolin-5-carboxylat zu L-Prolin reduzieren (Abbildung 3.5).



**Abbildung 3.5: Postulierter Abbauweg von 4-Hydroxyprolin zu L-Prolin in *C. difficile*.** Erster Schritt: putative 4-Hydroxyprolin-Dehydratase (EC 4.2.1.-, CDIF630erm\_03582/3). Zweiter Schritt: Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktase (EC 1.5.1.2, CDIF630erm\_03581)

Mit SyntTax [225] konnte eine ähnliche genomische Struktur, einschließlich eines Gens mit mindestens 66 % Proteinsequenzidentität zur vorgeschlagenen 4-Hydroxyprolin-Dehydratase, in diversen Stämmen von *Clostridium botulinum* und *Clostridium sporogenes* gefunden werden. Vom bisher nicht sequenzierten *C. sporogenes* NCTC 533 ist bekannt, dass er 4-Hydroxyprolin als Wasserstoffakzeptor verwendet [114]. *Oscillibacter valericigenes* Sjm18-20 [264] verfügt über ein Operon, welches für einen Symporter, eine L-Glutamat- $\gamma$ -semialdehyd-Dehydrogenase (EC 1.2.1.88), eine Aktivase für Glycylradical-Enzyme und ein Protein mit 68 % Sequenzidentität zur vorgeschlagenen 4-Hydroxyprolin-Dehydratase von *C. difficile* codiert. Pyrrolin-5-carboxylat liegt in wässriger Lösung im Gleichgewicht mit L-Glutamat-5-semialdehyd vor [265], das von der L-Glutamat- $\gamma$ -semialdehyd-Dehydrogenase zu L-Glutamat reduziert werden kann. Somit könnte dieses Operon in *O. valericigenes* alle nötigen Gene für den Import von 4-Hydroxyprolin und dessen Umwandlung in L-Glutamat bereitstellen, was die vorgeschlagene Funktion des Proteins von *C. difficile* unterstützt.

Zellextrakte von *C. difficile* 630 $\Delta$ erm aus MDM mit zusätzlichem 4-Hydroxyprolin wurden mit 4-Hydroxyprolin sowie NADPH oder NADH inkubiert. Mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC/MS) konnte ein strikt NADPH-abhängiger Anstieg der Prolinkonzentration im Assay nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung von Meina Neumann-Schaal), was dem oben vorgeschlagenen Abbauweg entspricht. Die Anwesenheit des Intermediats konnte mittels GC/MS

nicht nachgewiesen werden, da das Molekül während der für die Probenaufarbeitung notwendigen Trocknung zerstört wird [265, 266].

Der vorgeschlagene Stoffwechselweg zur Umwandlung von 4-Hydroxyprolin über (*S*)-1-Pyrrolin-5-carboxylat zu L-Prolin durch *C. difficile* wird unterstützt von zwei Beobachtungen von Jackson *et al.* [267]: Erstens, für das Prolin-auxotrophe *C. difficile* kann 4-Hydroxyprolin das Prolin in einem definierten Medium ersetzen. Zweitens, 4-Hydroxyprolin induziert die Produktion der D-Prolin-Reduktase des Prolinabbauwegs zu 5-Aminovalerat, ist aber nicht direkt dessen Substrat.

### 3.1.5 Abbau von Histidin

Im Genom von *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* konnten keine Gene für Enzyme bekannter Histidin-Abbauwege gefunden werden. Das Genom von *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* enthält Gene für Transaminasen aromatischer Aminosäuren (EC 2.6.1.57) und die Indolpyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (EC 1.2.7.8). Für letztere konnte bei anderen Organismen gezeigt werden, dass sie sehr promiskuitiv ist, wobei Imidazolpyruvat nie als Substrat getestet wurde [130, 132, 268] (siehe Tabelle 3.3).

**Tabelle 3.3: Substrate der Indolpyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase.** *P. f.*: *P. furiosus*; *M. m.*: *M. marburgensis*; *T. p.*: *T. profundus*; +: Aktivität; -: Keine Aktivität; n. g.: nicht getestet.

Substrat (dazugehörige Aminosäure)	<i>P. f.</i> [130]	<i>M. m.</i> [132]	<i>T. p.</i> [268]
Oxalacetat (Asp)	—	n. g.	n. g.
2-Oxoglutarat (Glu)	—	—	n. g.
Pyruvat (Ala)	—	—	n. g.
2-Oxobutanoat (2-Aminobutanoat)	—	—	n. g.
2-Oxoisovalerat (Val)	—	—	n. g.
2-Oxoisocaproat (Leu)	+	n. g.	n. g.
2-Oxo- $\gamma$ -methylthiobutanoat (Met)	+	n. g.	n. g.
Phenylpyruvat (Phe)	+	+	+
<i>p</i> -Hydroxyphenylpyruvat (Tyr)	+	n. g.	+
Indolpyruvat (Trp)	+	+	+
Imidazolpyruvat (His)	n. g.	n. g.	n. g.

Um die Hypothese des Histidinabbaus über oxidative Stickland-Reaktionen zu testen, wurde *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* in mit L-Histidin und L-Threonin versetztem MDM



kultiviert. Mittels HPLC/MS von CoA-Estern konnte ein CoA-Derivat mit der Masse von Imidazolyl-acetyl-CoA und mittels GC/MS 4-Imidazoleacetat nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung von Meina Neumann-Schaal), welche beide beim oxidativen Abbau von L-Histidin über Stickland-Reaktionen zu erwarten sind. Es ist daher wahrscheinlich, dass L-Histidin durch die gleichen Enzyme abgebaut wird wie die anderen aromatischen Aminosäuren.

Mead [269] konnte bereits 1971 zeigen, dass *C. difficile* 871 Histidin in größeren Mengen aufnimmt. Außerdem wurde Histidin bereits 1934 von Stickland [114] für *C. sporogenes* als Substrat für oxidative Stickland-Reaktionen identifiziert, wobei dies nur auf der schwachen Reaktion eines Indikators auf die Abspaltung der Aminogruppe des Cosubstrats Glycin basierte. Im Gegensatz dazu konnten weder Gene für einen Histidinabbau zu L-Glutamat noch eine Indolepyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase mittels BLASTp [196] in allen sequenzierten Stämmen von *C. sporogenes* gefunden werden. Soweit bekannt, ist der hier präsentierte Histidinabbau von *C. difficile* der erste Bericht zur Nutzung von Histidin über klassische oxidative Stickland-Reaktionen.

#### 3.1.6 Essenzielle Aminosäuren

Der Aminosäurebedarf verschiedener Stämme von *C. difficile* wurde von Haslam *et al.* [100] und Karasawa *et al.* [101] bestimmt. Hierfür wurde stets eine Aminosäure des definierten Mediums aus 18 Aminosäuren (ohne Glutamin und Asparagin), Glucose (nur [101]), Vitaminen und Salzen nicht hinzugefügt um den Einfluss der einzelnen Aminosäuren zu untersuchen. Fehlten Isoleucin, Leucin, Prolin oder Valin, konnte bei keinem Stamm eine Steigerung der OD nach 24 h oder 96 h festgestellt werden [100, 101]. Kulturen ohne Cystein, Methionin oder Tryptophan zeigten höchstens eine minimale Erhöhung der OD im gleichen Zeitraum [100, 101]. Diese Ergebnisse führten zu einem Minimalmedium mit diesen sieben Aminosäuren [91, 102]. Demgegenüber sind im Genom von *C. difficile* 630 $\Delta_{erm}$  Enzyme für Biosynthesewege aller Aminosäuren außer Tryptophan codiert. Die schwache Steigerung der OD, die von Karasawa *et al.* [101] beobachtet wurde, könnte somit auch durch cytosolische Reste des für das Wachstum nur geringfügig benötigten Tryptophans (vgl. Tabelle A.3) hervorgerufen worden sein.

Prolin könnte entweder aus 4-Hydroxyprolin (siehe Kapitel 3.1.4) oder durch Umkehrung des Abbauwegs aus 5-Aminovalerat produziert werden. Letzteres ist wahrscheinlich der Fall, wenn nach 3,5 h Wachstum in MDM das Prolin komplett konsumiert ist und die OD<sub>600</sub> noch mehrere Stunden weiter zunimmt [102]. Nichtsdestotrotz wird durch beide Wege Prolin nicht *de novo* produziert und die Annotation ist konform mit den Ergebnissen von Karlsson *et al.* [91], da beide Metabolite nicht Teil des Mediums waren.

Die notwendigen Gene für die Biosynthese der verzweigten Aminosäuren Isoleucin, Leucin, und Valin sind im Genom vorhanden. Karasawa *et al.* [101] testeten den Aminosäurebedarf durch Ausschluss einzelner Aminosäuren, wobei jeweils die anderen beiden verzweigten Aminosäuren in hoher Konzentration vorhanden waren. Da die Biosynthesewege der verzweigten Aminosäuren sich diverse Enzyme teilen, kann davon ausgegangen werden, dass die Regulation nicht unabhängig verläuft. Die Kultur von *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* in MDM ohne die drei Aminosäuren zeigte allerdings kein Wachstum (persönliche Mitteilung von Meina Neumann-Schaal). Im Gegensatz dazu zeigten Kulturen in CDMM nach der kompletten Aufnahme von Leucin und Isoleucin weiter Wachstum [102], weshalb die Aktivität der Biosynthesewege der verzweigten Aminosäuren in *C. difficile* weiter unklar bleibt.

Für die Biosynthese der schwefelhaltigen Aminosäuren sind ebenfalls Gene in *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* vorhanden, wobei für beide Sulfid als Schwefelquelle benötigt wird. Sulfid kann von *C. difficile* gegebenenfalls aus Sulfit - mittels Sulfit-Reduktase (EC 1.8.1.-) - aber nicht aus Sulfat gebildet werden [95]. Der Abbauweg von Cystein führt wieder zu Sulfid, wohingegen beim Abbau von Methionin, basierend auf der Genomannotation von Stamm 630 $\Delta$ *erm*, Methanthiol gebildet wird. Dies könnte erklären warum in diesem Stamm kein Wachstum in Medium ohne Cystein aber eine schwache Steigerung der OD im Medium ohne Methionin feststellbar war [95]. Andererseits könnte der Effekt aber auch wie im Fall von Tryptophan (s. o.) durch Restbestände dieser nur in geringen Mengen benötigten Aminosäure (vgl. Tabelle A.3) hervorgerufen worden sein. Ein weiterer Grund für die Auxotrophie bezüglich Methionin könnte der Bedarf an Cofaktoren für die Biosynthese sein. Beispielsweise wird Succinyl-CoA, welches nur als Nebenprodukt der NADH-Biosynthese erzeugt wird, für die Biosynthese benötigt (siehe Abbildung 3.2). Nichtsdestotrotz scheint *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* fähig zu sein Cystein und Methionin zu synthetisieren, da Kulturen in MDM und CDMM schon Stunden vor dem Erreichen der stationären

Wachstumsphase beide Aminosäuren komplett aufgenommen haben [102] und mit Sulfid oder Thiosulfat als Kohlenstoffquelle wächst [95].

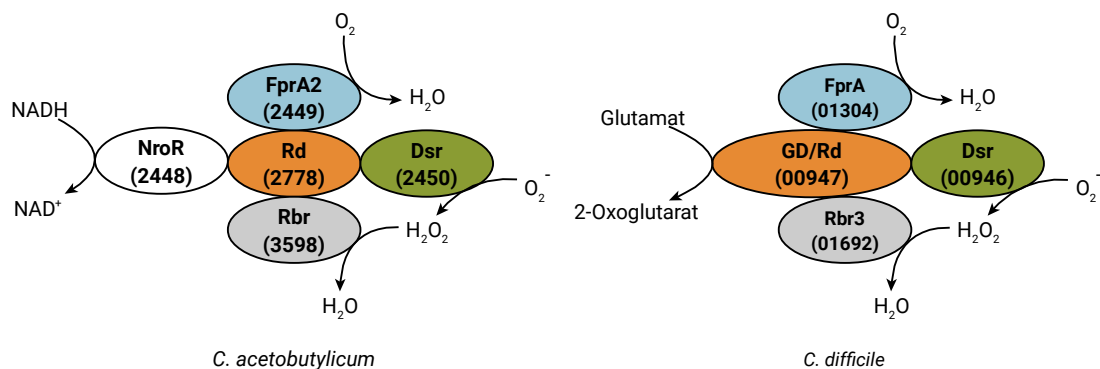
### 3.1.7 Vitamin B12

Gene für einen Großteil der Enzyme der Biosynthese von Vitamin B12 konnten in *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* gefunden werden. Basierend auf dem Genom ergeben sich aber drei Lücken in der Biosynthese: Erstens, für die Synthese von 5-Aminolevulinat für das Tetrapyrrol-Grundgerüst fehlen entweder die 5-Aminolevulinat-Synthase (EC 2.3.1.37) oder die Glutamyl-tRNA-Reductase (EC 1.2.1.70) sowie die Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase (EC 5.4.3.8). Zweitens, es konnte kein Homolog zu einer bekannten Cob(II)yrinat-a,c-diamid-Reduktase gefunden werden. Drittens, in *C. difficile* existieren keine Homologe zu den kürzlich von Hazra *et al.* [270] in *Eubacterium limosum* gefunden Genen zur anaeroben Synthese des unteren Liganden. Um den Vitamin B12-Bedarf von *C. difficile* abzuschätzen wurden mit InterProScan [224] nach Cobalamin-Bindedomänen im Stamm 630 $\Delta$ *erm* gesucht und vier Proteine detektiert: die  $\beta$ -Untereinheit der D-Ornithin-Aminomutase (CDIF630erm\_00574, EC 5.4.3.5), ein Dimethylamin-Corrinoid-Protein (CDIF630erm\_01923), ein Protein mit einer putativen Radikal-SAM-Domäne (CDIF630erm\_00829) und die Methionin-Synthase (CDIF630erm\_03918, EC 2.1.1.13). Des Weiteren ist die Ethanolamin-Ammonium-Lyase (EC 4.3.1.7) von *Clostridium* sp. (DSM 1975) Vitamin B12-abhängig [271, 272], weshalb dies vermutlich auch auf das Enzym von *C. difficile* zutrifft. *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* trägt außerdem ein Gen für eine Vitamin B12-abhängige Ribonucleosid-diphosphat-Reduktase (EC 1.17.4.1) homolog zum von Dawes *et al.* [273] charakterisierten Enzym aus *Mycobacterium tuberculosis*. Dieses Enzym ist für die Betrachtung des B12-Metabolismus allerdings wenig relevant, da auch ein Homolog zur Vitamin B12-unabhängigen Ribonucleosid-triphosphat-Reduktase (EC 1.17.4.2) von *E. coli* [274, 275] vorhanden ist.

Auf Basis dieses Wissens wäre folglich ein Mangel an Vitamin B12 nur unter gleichzeitigem Mangel an Methionin kritisch. Da Methionin Teil des MDM ist aber nicht Vitamin B12, wurde das Wachstum von *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* in MDM ohne Methionin aber mit 25  $\mu$ g/L Vitamin B12 getestet, wobei kein Wachstum beobachtet werden konnte (persönliche Mitteilung von Julia Hofmann). Somit bleibt weiter unklar ob *C. difficile* funktionale Biosynthesewege für Methionin und Vitamin B12 besitzt.

### 3.1.8 Detoxifikation reaktiver Sauerstoffspezies

Das Genom von *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* enthält homologe Gene für die drei terminalen rubredoxinabhängigen katalytischen Untereinheiten des Detoxifikationskomplexes reaktiver Sauerstoffspezies, die schon aus *C. acetobutylicum* bekannt sind [276]. Hierbei reduziert das Flavo-diiron-Protein A (EC 1.6.3.-)  $O_2$  zu  $H_2O$ , das Desulfoferredoxin (EC 1.15.1.2)  $O_2^-$  zu  $H_2O_2$  und das reverse Rubrerythrin (EC 1.11.1.-)  $H_2O_2$  zu  $H_2O$ . Im Gegensatz zu *C. acetobutylicum* konnte in *C. difficile* keine NADH-Rubredoxin-Oxidoreductase (EC 1.18.1.1) gefunden werden. Die einzige weitere im Genom codierende Rubredoxin-Domäne (InterPro: IPR024935) ist mit einem Homolog zur FMN-Bindedomäne von Glutamat-Synthasen verbunden. Von diesen Domänen ist bekannt, dass sie 2-Oxoglutarat aminieren [277], weshalb dieses Protein vermutlich unter Reduktion von Rubredoxin Glutamat zu 2-Oxoglutarat reduziert. Das entsprechende Gen ist Teil eines Operons (CDIF630erm\_00944-00947), welches auch für ein putatives Ruberythin, den Peroxid-Antwort-Repressor (PerR) und das  $O_2^-$ -reduzierende Desulfoferrodoxin codiert. Die vorhergesagte Glutamat-Dehydrogenase könnte im Detoxifikationskomplex reaktiver Sauerstoffspezies von *C. difficile* die NADH-Rubredoxin-Oxidoreductase ersetzen und über die Reduktion von Glutamat reduziertes Rubredoxin bereitstellen (Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6: Detoxifikation reaktiver Sauerstoffspezies.** Vergleich der Enzymkomplexes von *C. acetobutylicum* ATCC 824 [276] und dem vorgeschlagenen Komplex von *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm*. In Klammern sind die Locus-Tag-Nummern ohne Präfix (CA\_C und CDIF630erm\_) angegeben. NroR: NADH-rubredoxin-Oxidoreductase (EC 1.18.1.1); FprA: Flavo-diiron-Protein A (EC 1.6.3.-); Rd: Rubredoxin; Dsr: Desulfoferrodoxin (EC 1.15.1.2); Rbr: reverses Rubrerythrin (EC 1.11.1.-); GD/Rd: Glutamat-Dehydrogenase (Rubredoxin, EC 1.4.-.-).

In *C. difficile* kann das notwendige Glutamat entweder durch die Transaminierung von Aminosäuren während deren Abbaus oder durch die Rückreaktion der Glutamat-Dehydrogenase (EC 1.4.1.2) bereitgestellt werden. Dies könnte die zuvor von Girinathan *et al.* [278] beschriebene Abhängigkeit des Organismus von seiner Glutamat-Dehydrogenase unter  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Stress erklären.

### 3.1.9 Purinabbau in *Clostridioides difficile*

Von Larocque *et al.* [279] wurde der 1942 von Barker und Beck [280] erstmals beschriebene Purin-Abbauweg in *Gottschalkia acidurici* und *Clostridium cylindrosporum* für *C. difficile* 630 vorgeschlagen. Dieser Abbauweg (Abbildung A.1) wurde von Mitte der 50er bis Anfang der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts von der Gruppe um J. C. Rabinowitz charakterisiert [281–289].

Da die ersten DNA-Sequenzierungsmethoden wie beispielsweise die Methode nach Sanger *et al.* [290] erst in den 70er Jahren entwickelt wurden, enthalten diese Arbeiten keine Sequenzinformationen zu den beteiligten Genen. Erst kürzlich wurden *G. acidurici* 9a [291] und *C. cylindrosporum* HC-1 [292] sequenziert, ohne aber entsprechende Gene für den Abbau bis zum Glycin und Formiminotetrahydrofolat vorzuschlagen. Da es sich nur bei der Sequenz von *G. acidurici* 9a um ein geschlossenes Genom handelt [291, 292], wurde das Genom dieses Stammes für die Suche nach möglichen Genen für den Abbauweg verwendet. Für alle Reaktionen des Purin-Abbauwegs, für die bisher keinerlei Sequenzen bekannt waren, konnten mögliche Gene kondensiert mit anderen Genen des Purin- oder Tetrahydrofolat-Metabolismus in zwei Regionen des Genoms von *G. acidurici* 9a identifiziert werden (Tabelle 3.4, siehe Tabelle A.13 für Details der Sequenzanalysen).

Basierend auf den Sequenzen und der Anordnung der Gene konnten weitere Erkenntnisse zu zwei Enzymen des Abbauwegs gewonnen werden. So ist die vorgeschlagene 4-Aminoimidazolcarboxylat-Decarboxylase homolog zu bekannten 4-Hydroxy-3-poly-prenylbenzoat-Decarboxylasen (EC 4.1.1.98). Dieses Enzym benötigt eine Flavin-Prenyltransferase [293, 294]. Dies gilt aufgrund der ähnlichen Sequenz und Funktion vermutlich auch für das Enzym aus *G. acidurici*, wobei ein entsprechendes Gen direkt stromabwärts zu finden ist. Außerdem befindet sich das vorgeschlagene Gen für die 4-Aminoimidazol-Deaminase zwischen Genen für Mikrocompartment-Proteine. Das Produkt 4-Imidazolon ist außerordentlich reaktionsfähig [286] und nur unter

reduzierenden Bedingungen aktiv [285], weshalb die Unterbringung dieses Enzyms in einem Mikrocompartment nötig sein könnte.

**Tabelle 3.4: Vorgeschlagene Gene für den Purin-Abbau in *G. acidurici* 9a.** Siehe Tabelle A.13 für Details der Sequenzanalysen.

Genlocus	Vorgeschlagene Funktion	EC-Nummer
Curi_c03010	Glycin-Formimidoyltransferase	2.1.2.4
Curi_c03020	Format-Tetrahydrofolat-Ligase	6.3.4.3
[...]		
Curi_c29030	Adenin-Deaminase	3.5.4.2
Curi_c29040	Porenbildendes Mikrocompartment-Protein	
Curi_c29050	4-Aminoimidazol-Deaminase	3.5.8.4
Curi_c29060	Mikrocompartment-Protein	
Curi_c29070	Mikrocompartment-Protein	
Curi_c29080	Putatives Mikrocompartment-Protein	
Curi_c29090	Mikrocompartment-Protein	
Curi_c29100	4-Aminoimidazolcarboxylat-Decarboxylase	4.1.1.-
Curi_c29110	Flavin-Prenyltransferase	2.5.1.129
Curi_c29120	4-Ureido-imidazolcarboxylate-Amidohydrolase	3.5.1.-
Curi_c29130	Xanthin-Amidohydrolase	3.5.2.-
Curi_c29140	4-Imidazolonase	3.5.2.-
Curi_c29150	Purinkatabolismus-Regulator	
Curi_c29160	Formiminotetrahydrofolat-Cyclodeaminase	4.3.1.4
	Methenyltetrahydrofolat-Cyclohydrolase	3.5.4.9
Curi_c29170	Purin-Permease	
Curi_c29180	Purin-Permease	
Curi_c29190	Format-Transporter	

Mit den Sequenzen aus *G. acidurici* 9a wurde mittels BLASTp [196] nach entsprechenden Genen in *C. cylindrosporum* HC-1 und *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* gesucht. Während in ersterem alle Gene in einer ähnlichen Anordnung gefunden werden konnten (siehe Tabelle A.14), konnten keine homologen Gene in *C. difficile* identifiziert werden. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass *C. difficile* Purine nicht homolog zu *G. acidurici* und *C. cylindrosporum* abbaut.

### 3.1.10 Gallensäurenmetabolismus

Im Genom von *C. difficile* 630 $\Delta_{erm}$  konnte ein Gen mit 57 % Proteinsequenzidentität zur NADP-abhängigen 7 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase von *Clostridium sordellii* [295] identifiziert werden. Die entsprechenden Produkte waren zuvor schon in Gallensäure-supplimentierten Kulturen von *C. difficile* ATCC 9689 nachgewiesen worden [296]. Dieser Stamm wurde kürzlich sequenziert [184] und trägt ein entsprechendes Gen mit 99 % Proteinsequenzidentität zum Stamm 630 $\Delta_{erm}$ . Midtvedt und Norman [296] hatten außerdem zeigen können, dass dieser Stamm zwar Taurocholat aber kein Glycocholat spalten kann, was einzigartig unter den 55 untersuchten Mikroorganismen war. Üblicherweise werden beide Gallensäuren durch die Choloylglycin-Hydrolase (EC 3.5.1.24) gespalten, zu der allerdings kein homologes Gen in *C. difficile* gefunden werden konnte. Allerdings hat CDIF630erm\_02171 25 % Proteinsequenzidentität mit der murinen Gallensäuren-CoA:Aminosäure-N-acyltransferase, von der gezeigt werden konnte, dass sie spezifisch für Taurocholat ist [297]. Dieses Enzym könnte zusammen mit der in beiden Stämmen direkt stromabwärts codierenden Permease für den Import und die Detaurinierung der primären Gallensäuren sorgen.

Cholat, Glycocholat und Taurocholat stimulieren die Auskeimung von *C. difficile*-Sporen und inhibieren nicht das Wachstum, wohingegen Deoxycholat zwar auch zur Keimung von Sporen führt, aber das Wachstum inhibiert [43, 44]. *Clostridium scindens* dehydroxyliert Gallensäuren [298], was als Grund für die wachstumshemmende Wirkung *in vivo* von *C. scindens* auf *C. difficile* vorgeschlagen wurde [299, 300]. Die Oxidation der 7 $\alpha$ -Hydroxy-Gruppe durch die 7 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase von *C. difficile* könnte deshalb diese Dehydroxylierung verhindern und eine Hemmung des Wachstums bei geringen Populationen von *C. scindens* verhindern (Abbildung 3.7).

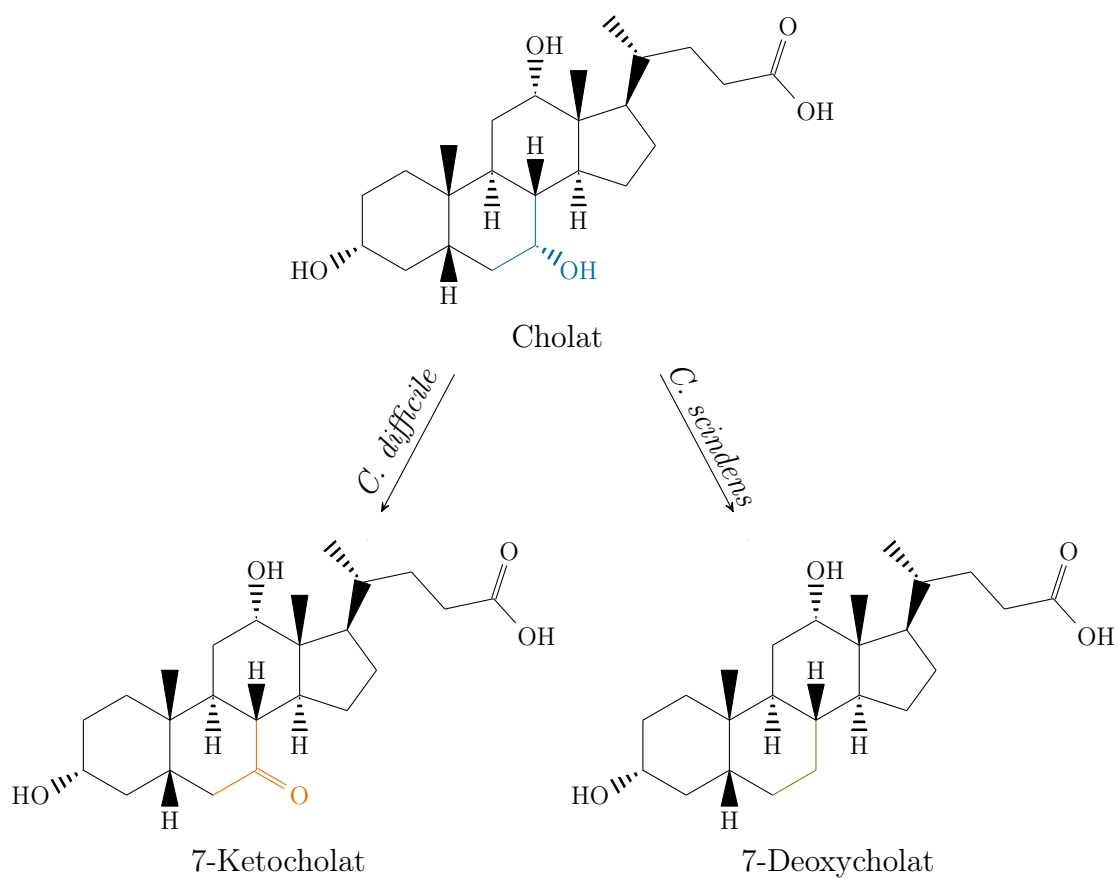


Abbildung 3.7: Modifikationen des Cholats durch *C. difficile* und *C. scindens* [296, 298].



## 3.2 Modellierung von *Clostridioides difficile*

### 3.2.1 Das Modell *i*HD992

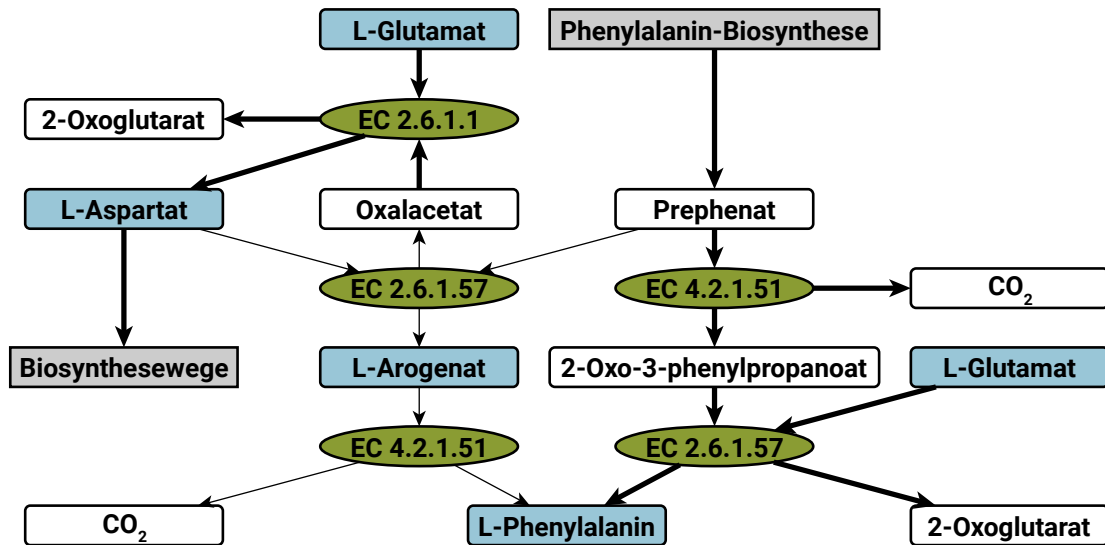
Das Modell *i*HD992 wurde basierend auf der neuesten Sequenzierung und Annotation des Stammes 630 $\Delta_{erm}$  aufgebaut. Es beinhaltet 992 Gene, 786 metabolische Reaktionen, 163 Transportreaktionen, 161 Austauschreaktionen und 936 Metabolite. Mittels optimaler FVA konnten für 3 h Wachstum in MDM 413 der 1125 Reaktionen als für eine optimale Lösung essenziell identifiziert werden (möglicher Fluss  $\neq 0$  mmol/(g<sub>BTM</sub> h)). Außerdem konnten 93 Reaktionen ( $< 1\%$ ) als variable Reaktionen identifiziert werden. Von diesen können 86 bei einer optimalen Lösung einen Fluss von 0 mmol/(g<sub>BTM</sub> h) haben. Diese Reaktionen sind folglich Teil eines redundanten Weges oder ihr Fluss hat anderweitig keinen Einfluss auf das erreichbare Ergebnis. Außerdem existieren 7 Reaktionen, deren Fluss variabel ist, aber nicht 0 mmol/(g<sub>BTM</sub> h) annehmen kann (siehe Tabelle 3.5). Diese Reaktionen sind sowohl Teil eines einzigartigen optimalen Wegs als auch Teil eines eines redundanten optimalen Wegs.

**Tabelle 3.5: Sowohl notwendige als auch variable Reaktionen in *i*HD992.** Ein Fluss wird als notwendig erachtet, wenn er in einer optimalen FVA nicht einen Fluss von 0 mmol/(g<sub>BTM</sub> h) annehmen kann. Als Szenario wurden die Bedingungen bei 3 h Wachstum in MDM verwendet.

Reaktions-ID	Funktion
aspartate_2.6.1.1_ASPAMINOTRANS-RXN	Transaminierung von Oxalacetat zu Aspartat
ferm-acetate/1_1.2.7.1_PYRUFLAVREDUCT-RXN	Reduktion von Pyruvat zu Acetyl-CoA und CO <sub>2</sub>
glycolysis-I/3_4.1.2.13_F16ALDOLASE-RXN	} Teil der Glycolyse
glycolysis-IV/2c_2.7.1.90_2.7.1.90-RXN	
NXP-transitions_2.7.4.3_BS358186	} Nucleosid-Metabolismus
NXP-transitions_2.7.4.3_CDPKIN-RXN	
NXP-transitions_2.7.4.6_GDPKIN-RXN	

Ein gutes Beispiel hierfür ist die Aspartat-Transaminase (EC 2.6.1.1), die mittels L-Glutamat Oxalacetat aminiert, wobei L-Aspartat und 2-Oxoglutarat entstehen. Die primäre Aufgabe der Aspartat-Transaminase ist die Bereitstellung von L-Aspartat, das für diverse Biosynthesewege (Proteinbiosynthese, NAD-Biosynthese, *etc.*) zwin-

gend benötigt wird. Abbildung 3.8 zeigt warum die Aktivität der Aspartat-Transaminase trotzdem variabel ist.

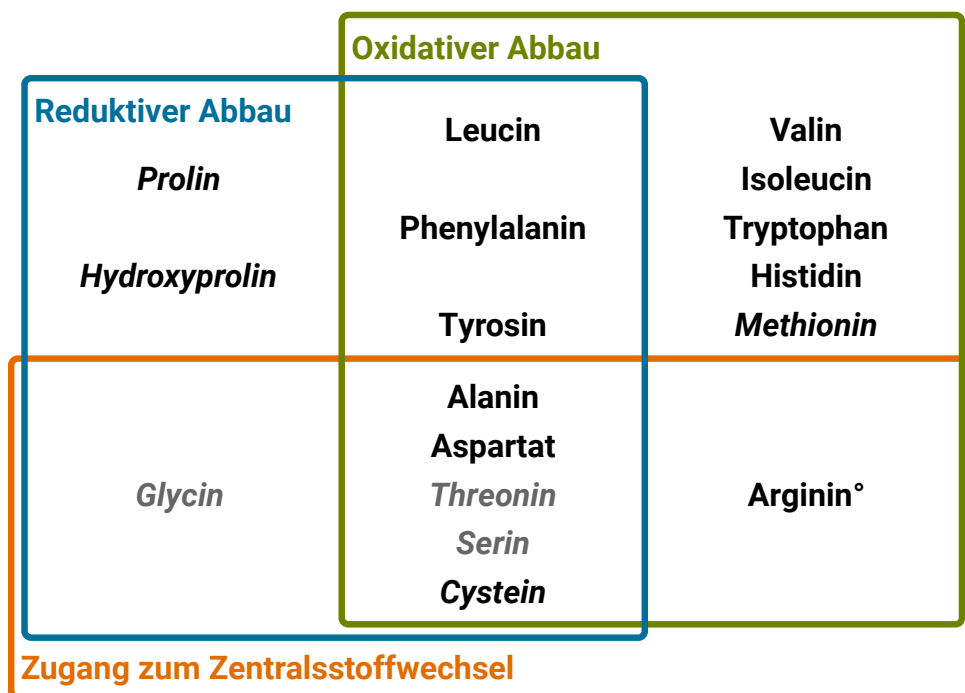


**Abbildung 3.8: Variabilität und Notwendigkeit der Aspartat-Transaminase.** Zur Vereinfachung werden nicht alle Substrate und Produkte gezeigt. Die Richtung der Pfeile zeigt die übliche Flussrichtung an. Dicke Pfeile: Primärweg; dünne Pfeile: Nebenreaktionen, blau: aminierte Metabolite; weiß: andere Metabolite; grün: Reaktionen; grau: Stoffwechselwege.

Bei der üblichen Biosynthese von L-Phenylalanin wird Prephenat zuerst decarboxyliert und dann durch die Übertragung einer Aminogruppe von L-Glutamat zu L-Phenylalanin (Abbildung 3.8). Für die beiden beteiligten Enzyme beinhaltet *BKM-react* [227], auf dem das Modell *iHD992* basiert, allerdings zwei Nebenreaktionen, die eine Aminierung von Prephenat mit L-Aspartat zu L-Arogenat (EC 2.6.1.57) gefolgt von einer Decarboxylierung zu L-Phenylalanin (EC 4.2.1.51) erlauben. Dieser Weg ist energetisch äquivalent zum primären Syntheseweg. Da die Aminogruppe in diesem Fall den Umweg über das L-Aspartat nimmt, statt direkt von L-Glutamat auf Prephenat oder 2-Oxo-Phenylpropanoat übertragen zu werden, führt dies zur Variabilität der Aspartat-Transaminase.

Als weiteres Beispiel für eine Reaktion, deren Aktivität für eine optimale Lösung variabel und notwendig ist, wird die Aktivität der Fructose-6-phosphat-1-Phosphotransferase (EC 2.7.1.90) in Kapitel 3.5.2 diskutiert.

Für quantitative Simulationen des Wachstums ist insbesondere ein korrekter Abbau der Substrate notwendig. Das Modell *iHD992* kann unter anderem Aminosäuren, Nucleotide und diverse Kohlenhydrate abbauen. Die Degradation der Aminosäuren über Stickland-Reaktionen ist von besonderer Bedeutung für den Metabolismus und Energiestoffwechsel von *C. difficile* [101–104]. Abbildung 3.9 zeigt eine Übersicht der Aminosäure-Abbauwege im Modell *iHD992*.



**Abbildung 3.9: Aminosäuredegradation über Stickland-Wege in *iHD992*.** Kursiv: keine Transaminierung oder Reduktion zur Desaminierung; grau: zusätzlich Abbau über Wood-Ljungdahl-Weg möglich (vgl. Kapitel 3.7.1); °: zusätzlich ein Redox-ausgeglichener Weg vorhanden.

Die meisten Aminosäuren können nur über Stickland-Reaktionen, die zu Alkansäuren führen, verstoffwechselt werden, wodurch große Mengen des Kohlenstoffs nicht für den Metabolismus zur Verfügung stehen. Im Falle des MDM kann sogar nur der Kohlenstoff aus Glucose und Cystein für den Aufbau von Proteinen und weiteren Biomassebestandteilen verwendet werden.

#### 3.2.2 Das Modell *iMLTC806cdf*

Während der Erstellung des Modells *iHD992* wurde von Larocque *et al.* [279] das Modell *iMLTC806cdf* veröffentlicht. Grundlagen waren die Annotationen von Kegg [206], MetaCyc [230] und TransportDB [301] sowie das Modell *iCAC490* [302]. Das Modell wurde verwendet um durch Blockierung von Reaktionen *in silico* essenzielle Gene vorherzusagen, die als Targets für Medikamente dienen könnten [279].

Um die Fähigkeiten des Modells von Larocque *et al.* [279] zur quantitativen Simulation des Wachstums zu testen, wurde eine FBA mit einem Szenario durchgeführt, das den aus Exometabolomdaten [102] abgeleiteten Substrataufnahmeraten in MDM bei 3 h Wachstum entspricht. Als Zielfunktion der FBA diente die Generierung von Biomasse. Die vorhergesagte Wachstumsrate betrug  $7,12 \text{ h}^{-1}$  und ist damit deutlich höher als die von experimentellen Daten [102] abgeleitete Rate von  $0,414 \text{ h}^{-1}$ . Das Wachstum ist nur durch die festgelegte Leucin-Aufnahmerate begrenzt, da dies in diesem Szenario das essenzielle Substrat mit dem höchsten Verhältnis von Bedarf zu Angebot im Modell *iMLTC806cdf* ist.

Das unrealistisch hohe Wachstum im Modell *iMLTC806cdf* ist insbesondere mit der Existenz von thermodynamisch unmöglichen Wegen zur Generierung von ATP und NADPH zu begründen: So existiert in *iMLTC806cdf* parallel zur ATP-Synthase, die unter Transport von Protonen in das Innere der Zelle und entgegen dem Gradienten ADP phosphoryliert, noch eine reversible Reaktion für den freien Transport von Protonen über die Membran. Außerdem ist eine reversible Ferredoxin-NAD<sup>+</sup>-Reduktase (EC 1.18.1.3) Teil des Modells, die Ferredoxin mit NADH reduziert. Dies ist *in vivo* nicht möglich, da Ferredoxin ein niedrigeres Redoxpotential besitzt als NAD<sup>+</sup>/NADH [105]. Indirekt kann somit auch über die NADP<sup>+</sup>-Reduktase (EC 1.18.1.2) NADP<sup>+</sup> mittels NADH reduziert werden, was *in silico* zu energetisch deutlich günstigeren Biosynthesewegen (z. B. Fettsäurebiosynthese) führt. Aufgrund dieser Fehler im Energiestoffwechsel des Modells kann mit *iMLTC806cdf* das Wachstum von *C. difficile* nicht quantitativ simuliert werden.

#### 3.2.3 Vergleich zwischen *iHD992* und *iMLTC806cdf*

Im Vergleich zum Modell *iMLTC806cdf* Larocque *et al.* [279] von *C. difficile* 630 enthält das Modell *iHD992* von 630 $\Delta_{erm}$  mehr Reaktionen, Metabolite, und Gene (Tabelle 3.6). Der Grund dafür sind hauptsächlich spezifische Stoffwechselwege von

*C. difficile* wie beispielsweise die Modifikationen des Flagellins oder der Gallensäuren, die nur im Modell *iHD992* vorhanden sind. Beide Modelle beinhalten Reaktionen, die auf der Annotation basieren, spontane Reaktionen und Reaktionen, die weder spontan sind noch auf der Annotation basieren. Während Reaktionen der ersten beiden Gruppen den Kern jedes Modells ausmachen sollten, sollten nur wenige Reaktionen der letzten Gruppe in einem Modell vorkommen. Diese Reaktionen werden üblicherweise in ein Modell eingefügt um Lücken in notwendigen Stoffwechselwegen zu schließen und somit ein funktionelles Modell zu erhalten. Das Modell *iHD992* weist im Vergleich zu *iMLTC806cdf* 83 % weniger Reaktionen auf, die weder sequenzbasiert sind noch spontan in der Zelle ablaufen können. Dies zeigt schon auf Basis der Reaktionen, dass das hier präsentierte Modell dem Modell von Larocque *et al.* [279] überlegen ist.

**Tabelle 3.6: Vergleich der Modelle *iHD992*, *iMLTC806cdf* und *icdf834*.**

Modell	<i>iHD992</i>	<i>iMLTC806cdf</i> [279]	<i>icdf834</i> [303]
Stamm	630 $\Delta_{erm}$	630	630
Metabolische Reaktionen	786	760	880
Nicht sequenzbasiert	44	149	191
Spontan	20	8	2
Nicht spontan	24	141	189
Transportreaktionen	163	145	153
Austauschreaktionen	161	171	176
Biomassereaktionen	15	9	9
Metabolite	936	704	807
Gene	992	806	834

Die beiden Modelle haben nur 508 gemeinsame metabolische Reaktionen. Dies entspricht 67 % der Reaktionen von *iMLTC806cdf* und ist sehr niedrig für Modelle des nahezu selben Organismus. Verglichen damit teilt sich *iMLTC806cdf* 385 (51 %) metabolische Reaktionen mit dem Modell *iCAC490* von *C. acetobutylicum* [279, 302]. Von den 262 Reaktionen aus *iMLTC806cdf*, die nicht in *iHD992* vorkommen, basieren 111 nicht auf der von Larocque *et al.* [279] verwendeten Annotation und auch sonst konnten keine Indizien für ihre Existenz in *C. difficile* gefunden werden. Weitere 140 Reaktionen wurden nicht für *iHD992* übernommen, da die aktuelle Annotation nicht für ihre Existenz in *C. difficile* spricht. Von den verbleibenden 11 Reaktionen wurden 6 ausgeschlossen, da sie metabolisch kostengünstigere Nebenreaktionen darstellen

als die Hauptreaktionen der entsprechenden Enzyme. Die restlichen 5 Reaktionen wurden nicht übernommen um die thermodynamisch unmögliche Reduktion von  $\text{NADP}^+$  mit NADH zu verhindern.

#### 3.2.4 Das Modell *icdf834*

Nahezu zeitgleich zum Modell *iHD992* und kurz vor Vollendung dieser Arbeit wurde das Modell *icdf834* veröffentlicht [185, 303]. Bei *icdf834* handelt es sich um ein Update des Modells *iMLTC806cdf* [279, 303]. Hierfür wurden 5 Austausch- und 8 Transportreaktionen sowie 142 metabolische Reaktionen hinzugefügt. Des weiteren wurden 19 Reaktionen entfernt und 71 weitere verändert. Der größte Unterschied zwischen den Modellen ist ein überarbeiteter Lipidmetabolismus mit 107 zusätzlichen, 2 veränderten und 16 entfernten Reaktionen. Die Anzahl der Reaktionen im Lipidmetabolismus wurde stark dadurch erhöht, dass jeder einzelne Biosynthese- und Abbauschritt der Fettsäuren enthalten ist und verschiedenen Fettsäuren für die Synthese der Lipide verwendet werden. Üblich ist hierbei generische Fettsäuren zu verwenden und diese in nur einer Reaktion herzustellen um das Modell nicht unnötig zu vergrößern [185, 243, 279]. Außerdem ist zweifelhaft, ob *C. difficile* einen Fettsäureabbau besitzt, da weder die notwendigen Gene identifiziert werden konnten, noch der oxidative Abbau metabolisch für einen nicht-atmenden Organismus sinnvoll ist. Das Modell *icdf834* besitzt mehr metabolische Reaktionen als *iHD992* (Tabelle 3.6). Allerdings wurde auch die Zahl der nicht sequenzbasierten Reaktionen, die nicht spontanen ablaufen können, im Vergleich zu *iMLTC806cdf* noch einmal deutlich gesteigert. Außerdem umfasst *icdf834* deutlich weniger Gene und Metabolite als *iHD992*. Für *icdf834* wurde der Energiemetabolismus von *iMLTC806cdf* übernommen, wodurch auch *icdf834* nicht für die Simulation quantitativen Wachstums geeignet ist.

### 3.3 Antibiotika-Targets in *Clostridioides difficile*

Genomweite metabolische Modelle können unter anderem dafür verwendet werden Antibiotika-Targets zu detektieren und so zur Entwicklung neuer Therapien beitragen. Larocque *et al.* [279] identifizierten mittels ihres Modells *iMLTC806cdf* und *in silico*-Knockouts 76 mögliche Targets für Medikamente. Von diesen 76 Genen, die 104 Reaktionen in *iHD992* katalysieren, sind 72 mindestens einer Reaktion zugeordnet (Tabelle A.15). Im Gegensatz dazu besitzt *iHD992* in einem Vollmedium mit allen vom Modell importierbaren Metaboliten 148 essenzielle metabolische Reaktionen. Diese sind meist beteiligt an der Synthese von Cofaktoren, Proteinen, Lipiden oder den Bestandteilen der Zellwand.

Nur 41 Reaktionen, die in *iHD992* essenziell sind, werden von Enzymen katalysiert, die von Larocque *et al.* [279] als Targets vorgeschlagen wurden. Die entsprechenden Stoffwechselwege sind insbesondere an der Synthese der Zellwand, der Zellmembran und von Cofaktoren beteiligt.

Fast allen gefundenen Targets ist gemein, dass sie viele Homologe in anderen Darmbakterien besitzen. Da Infektionen mit *C. difficile* besonders durch Antibiotika-Therapie und die damit einhergehende Zerstörung der Darmflora hervorgerufen werden [304], könnte eine entsprechende Behandlung eher schaden als nützen, falls der *C. difficile* -Stamm eine überdurchschnittliche Resistenz gegen das Antibiotikum besitzt.

Von Larocque *et al.* [279] wurde das Protein des Gens CDIF630erm\_02171 als Target vorgeschlagen, da es in *iMLTC806cdf* an der Fettsäurebiosynthese beteiligt ist. Sequenzanalysen legen nahe, dass das Gen stattdessen am Gallensäurenmetabolismus beteiligt sein könnte (siehe Kapitel 3.1.10). Sowohl zu diesem Protein als auch zur 7 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase konnten nur wenige Homologe in GenBank gefunden werden. Eine Therapie mit einem entsprechenden Antagonisten in Kombination mit einer Einbringung von *C. scindens* [43, 44] könnte daher eine schonendere und erfolgversprechendere Behandlung sein.

## 3.4 Produktion eines Exopolysaccharids

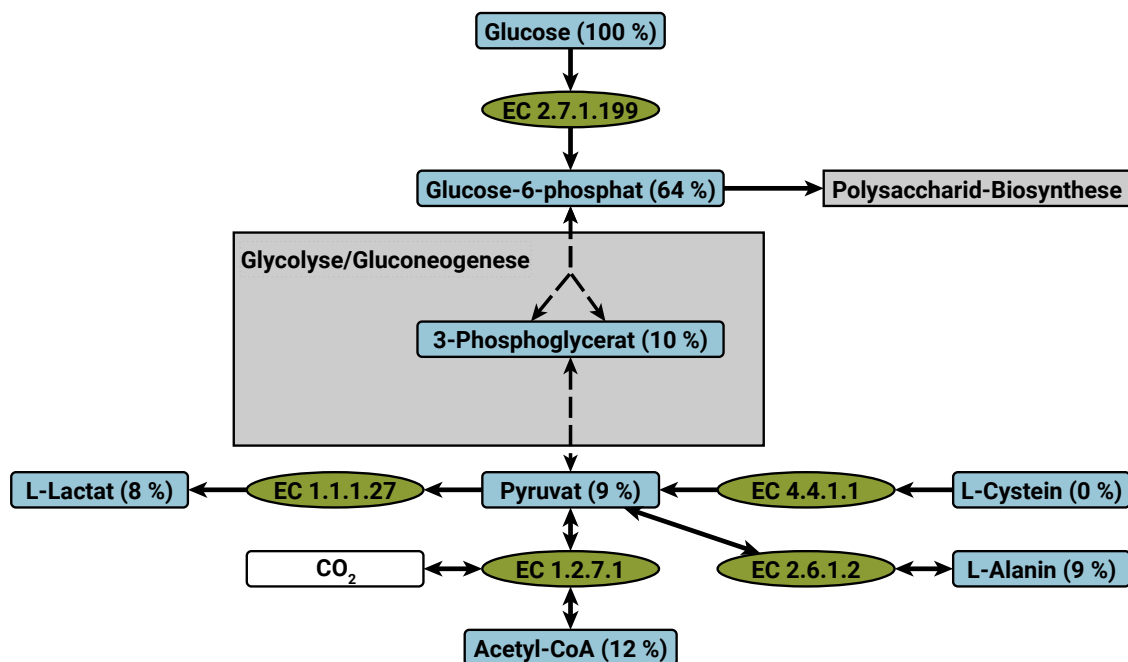
Das Modell *i*HD992 wurde, wie auch *i*MLTC806cdf (siehe Kapitel 3.2.2), entsprechend der Bedingungen bei 3 h Wachstum in MDM mit der Generierung der Biomasse als Zielfunktion getestet. Wie auch das Modell *i*MLTC806cdf (siehe Kapite 3.2.2) zeigte *i*HD992 mit  $3,59 \text{ h}^{-1}$  eine deutlich höhere Wachstumsrate als die aus experimentellen Daten [102] berechnete von  $0,414 \text{ h}^{-1}$ . Eine so große Differenz der Wachstumsrate deutet auf die Produktion eines bisher unbekannten Produkts hin, für dessen Aufbau der Überschuss an Kohlenstoff und Energie verwendet wird. Hierbei ist zu beachten, dass das Modell für das Wachstum in MDM nur Cystein und Glucose als direkt nutzbare Kohlenstoffquellen voraussagt. Die anderen sechs Aminosäuren des MDM können nur zur Generierung von Energie über Stickland-Reaktionen oder für die Proteinbiosynthese verwendet werden.

### 3.4.1 Gluconeogenese trotz Glucoseaufnahme in MDM

Um mehr über mögliche Nebenprodukte von *C. difficile* zu erfahren, wurde der Kohlenstoffmetabolismus mittels  $^{13}\text{C}$ -markierter Glucose untersucht. Hierfür wurde *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* in MDM mit voll markierter  $^{13}\text{C}$ -Glucose kultiviert, bei einer OD<sub>600</sub> von 0,220 geerntet und die intrazellulären Metabolite der Glycolyse sowie benachbarter Stoffwechselwege mittels GC/MS untersucht (siehe Tabelle A.16 für Details). Der Anteil der voll markierten Acetyl-Gruppen am Acetyl-CoA wurde mittels Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie (LC/MS) auf  $11,8 \pm 2,2 \%$  ( $88,8 \pm 1,7 \%$  unmarkiert) bestimmt. In Abbildung 3.10 sind vereinfacht die betroffenen Stoffwechselwege sowie der Anteil der voll markierten Spezies dargestellt. Alle detektierten Metabolite entlang des Wegs zwischen Cystein und Glucose wurden nur als vollständig markierte oder vollständig unmarkierte Spezies gefunden, wobei bei allen außer Cystein und Glucose eine Mischpopulation vorlag. Dies deutet auf einen kürzlichen geschehenen Übergang von Glycolyse zu Gluconeogenese hin, da unter stabilen Bedingungen die Metabolite der Glycolyse entweder aus unmarkiertem Cystein oder voll markierter Glucose gebildet worden sein müssten.

Auffällig ist, dass Glucose-6-phosphat zu 64 % markiert vorlag, wohingegen die anderen detektierten Metabolite nur zwischen 9 und 12 % markiert waren. Daraus folgt, dass der Kohlenstoff aus dem Zentralstoffwechsel und der Kohlenstoff aus der Glucose





**Abbildung 3.10: Ursprung der Kohlenstoffs im Zentralmetabolismus.** Kulturen von  $630\Delta_{erm}$  wurden bei einer  $OD_{600}$  von 0,220 geerntet. Als Medium wurde MDM mit komplett  $^{13}\text{C}$ -markierter Glucose verwendet. Der Anteil der vollständig  $^{13}\text{C}$ -markierten Metabolite ist in Klammern angegeben. Zur Vereinfachung wurde die Markierung des CoA ignoriert. Kultivierung und Messung wurden von Meina Neumann-Schaal durchgeführt. Die Richtung der Pfeile zeigt die übliche Flussrichtung an. Blau: Metabolite die mittels GC/MS oder LC/MS detektiert wurden; weiß: Andere Metabolite; grün: Reaktionen; grau: Stoffwechselwege.

bei Glucose-6-phosphat vereinigt werden und etwa 40 % aus der Gluconeogenese stammen. Das Modell *iHD992* beinhaltet für Glucose nur den Abbauweg über die Glycolyse, was darauf hindeutet, dass der Bedarf des Organismus an aktivierten Zuckern zum Zeitpunkt der Probenahme nicht durch die Aufnahme von Glucose gedeckt werden konnte, weshalb die Gluconeogenese aktiv war.

### 3.4.2 Produktion eines acetylierten Glucosepolymers

Das viskose Fließverhalten des Kulturüberstands von *C. difficile*  $630\Delta_{erm}$  und die Produktion von aktivierten Zuckern durch eine zeitweise aktive Gluconeogenese (siehe Kapitel 3.4.1) legen die Produktion eines Exopolysaccharids nahe. *C. difficile* besitzt in seinem Genom ein Operon, das wahrscheinlich für die Enzyme eines

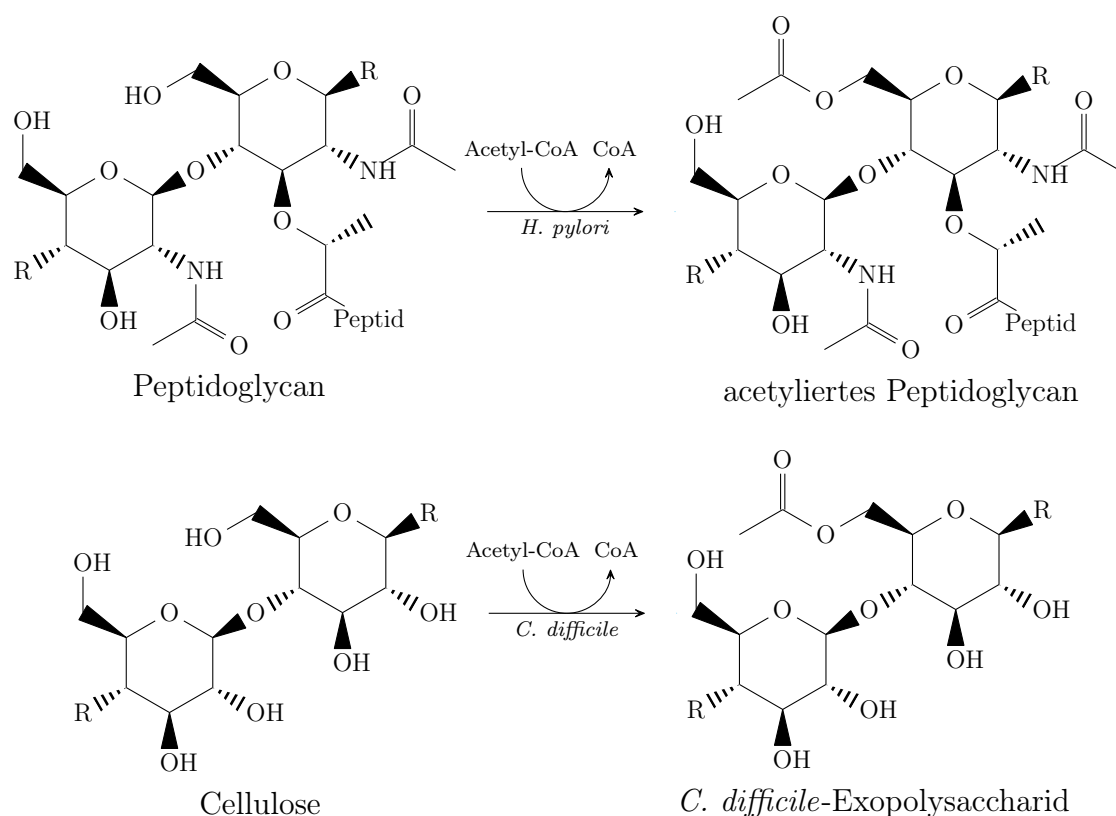
Polysaccharid-Biosynthesewegs codiert. Es besteht aus Genen, die für eine Membran-gebundene O-Acetyl-Transferase (EC 2.3.1.-), eine Cellulose-Synthase (EC 2.4.1.12), eine Endoglucanase (EC 3.2.1.4) und zwei Membranproteine unbekannter Funktion codieren (Tabelle 3.7). Die vorhergesagte Funktion der Proteine deutet somit auf die Biosynthese eines acetylierten Glucosepolymers hin.

**Tabelle 3.7: Vorgeschlagenes Operon zur Synthese des Exopolysaccharids.** Die Anzahl der Transmembranhelices wurde mit TMHMM 2.0 [305] vorhergesagt. TMH: Transmembranhelices.

Genlocus	Homolog	Vorgeschlagene Funktion	TMH
CDIF630erm_02794		Hypothetisches Protein	1
CDIF630erm_02795	O25526	O-Acetyltransferase (EC 2.3.1.-)	12
CDIF630erm_02796		Hypothetisches Protein	2
CDIF630erm_02797	P37653	Cellulose-Synthase (EC 2.4.1.12)	7
CDIF630erm_02798	Q9X273	Endoglucanase (EC 3.2.1.4)	1

Die N-terminale Domäne des von CDIF630erm\_02797 codierten Proteins hat eine Proteinsequenzidentität von 30 % zur katalytischen Untereinheit der Cellulose-Synthase von *E. coli*. Dies deutet darauf hin, dass es sich auch beim Exopolysaccharid von *C. difficile* um ein  $\beta$ -1,4-verknüpftes Glucosepolymer handeln könnte, für dessen Polymerisation UDP-Glucose verwendet wird. Die O-Acetyltransferase von *C. difficile* hat 35 % Proteinsequenzidentität zur Peptidoglycan-O-Acetyltransferase von *Helicobacter pylori*. Die Ergebnisse von Wang *et al.* [306] deuten darauf hin, dass das Enzym von *H. pylori* das N-Acetyl-Muramat an Position 6 acetyliert. Geht man von einer analogen Acetylierung in *C. difficile* aus, würde dies die Acetylierung jedes zweiten Glucosemoleküls von Cellulose bedeuten (siehe Abbildung 3.11).

Um diese Hypothesen zu testen, wurde die Konzentrationen von Glucose und Acetat im MDM- und CDMM-Kulturüberstand vor und nach saurer (Depolymerisation) und alkalischer (Deacetylierung) Hydrolyse bestimmt. Tabelle 3.8 bestätigt, dass der Großteil der Glucose in beiden Medien in ein Exopolysaccharid bestehend aus acetyliertem Glucosepolymer umgewandelt wurde. Während des Wachstums in MDM blieb das Verhältnis der Polysaccharid-Glucose zur aufgenommenen Glucose in etwa konstant bei 73 % (Tabelle 3.8). In CDMM, welches zusätzliche Aminosäuren im Vergleich zum MDM enthält, war die Glucoseaufnahme und Synthese des Polysaccharids im Vergleich zum MDM verzögert und das Verhältnis von Polysaccharid-Glucose zur



**Abbildung 3.11: O-Acetylierung von Polysacchariden.** Vergleich zwischen der Acetylierung des Peptidoglycans von *H. pylori* und der Acetylierung des vorgeschlagenen Exopolysaccharids von *C. difficile*.

aufgenommenen Glucose betrug nur 40 %. In beiden Medien konnten etwa 0,5 mol zusätzliches Acetat nach der alkalischen Hydrolyse pro Mol Polysaccharid-Glucose detektiert werden, was der vorgeschlagenen Struktur (siehe Abbildung 3.11) entspricht. Außerdem wurde kein Abbau des Exopolysaccharids durch *C. difficile* beobachtet. *C. acetobutylicum* ATCC824 besitzt ein ähnliches Operon, wobei beide Operons sich hauptsächlich darin unterscheiden, dass das Gen für die Endoglucanase in *C. acetobutylicum* nur als Fragment vorliegt (Tabelle A.17). Diese Funktion könnte möglicherweise aber auch eine andere Endoglucanase (z. B. CA\_C0826) erfüllen. In Übereinstimmung mit der Existenz eines ähnlichen Operons konnten Häggström und Förberg [307] beobachten, dass *C. acetobutylicum* unter bestimmten Bedingungen ein acetyliertes Polysaccharid sekretiert. Im Gegensatz zu *C. difficile* ist *C. acetobutylicum* außerdem in der Lage dieses Exopolysaccharid abzubauen [307]. *C. acetobutylicum* besitzt ein Cellulosom, kann aber nicht mit Cellulose als alleiniger

**Tabelle 3.8: Bildung des Exopolysaccharids in MDM und CDMM.** Kultivierung und Messung wurden von Meina Neumann-Schaal durchgeführt. Die Ausgangskonzentration der Glucose lag bei  $11,48 \pm 0,10$  mmol/L in MDM und  $11,68 \pm 0,14$  mmol/L in CDMM.

Medium	MDM		
Wachstumsphase	früh	spät	stationär
Optische Dichte (600 nm)	0,151	0,218	0,377
Glucose vor Hydrolyse [mmol/L]	$5,16 \pm 0,19$	$2,10 \pm 0,16$	$0,24 \pm 0,08$
Glucose nach Hydrolyse [mmol/L]	$9,82 \pm 0,16$	$8,88 \pm 0,16$	$8,54 \pm 0,19$
Acetat vor Hydrolyse [mmol/L]	$1,36 \pm 0,16$	$2,14 \pm 0,06$	$5,88 \pm 0,27$
Acetat nach Hydrolyse [mmol/L]	$3,87 \pm 0,09$	$5,06 \pm 0,07$	$9,18 \pm 0,09$
Glucose (gebunden/gesamt)	$0,73 \pm 0,05$	$0,72 \pm 0,03$	$0,74 \pm 0,02$
Acetylierungen pro Glucosemonomer	$0,54 \pm 0,05$	$0,43 \pm 0,02$	$0,39 \pm 0,04$

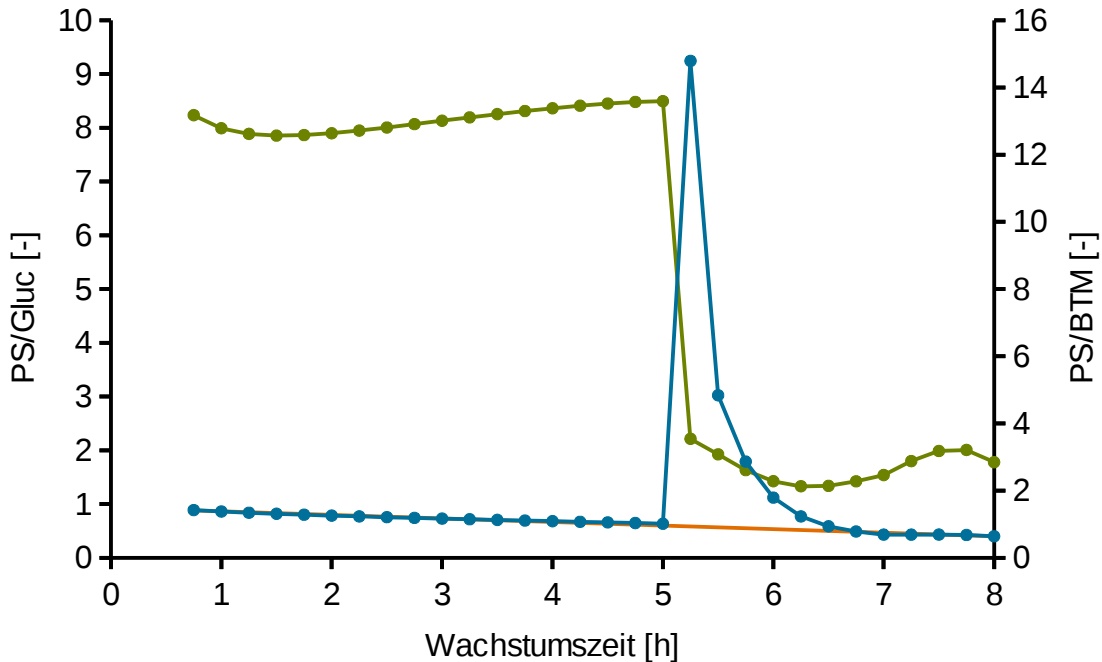
  

Medium	CDMM		
Wachstumsphase	früh	spät	stationär
Optische Dichte (600 nm)	0,326	0,725	1,169
Glucose vor Hydrolyse [mmol/L]	$11,47 \pm 0,26$	$3,05 \pm 0,12$	$0,07 \pm 0,14$
Glucose nach Hydrolyse [mmol/L]	$11,49 \pm 0,31$	$6,13 \pm 0,19$	$4,70 \pm 0,50$
Acetat vor Hydrolyse [mmol/L]	$2,37 \pm 0,05$	$14,01 \pm 0,41$	$18,89 \pm 0,24$
Acetat nach Hydrolyse [mmol/L]	$2,35 \pm 0,11$	$15,88 \pm 0,33$	$21,05 \pm 0,26$
Glucose (gebunden/gesamt)	–	$0,36 \pm 0,03$	$0,40 \pm 0,05$
Acetylierungen pro Glucosemonomer	–	$0,61 \pm 0,18$	$0,47 \pm 0,09$

Kohlenstoffquelle wachsen und es konnte nahezu keine Aktivität des Cellulosoms nachgewiesen werden [308]. Dies legt nahe, dass das tatsächliche Substrat des Cellulosoms von *C. acetobutylicum* das von Häggström und Förberg [307] entdeckte Exopolysaccharid sein könnte.

### 3.5 *Clostridioides difficile* 630 $\Delta$ erm in MDM

Durch die Verfügbarkeit von zeitaufgelösten Exometabolomdaten von *C. difficile* 630 $\Delta$ erm [102] sind zeitaufgelöste FBAs möglich. Diese erlauben es einen tieferen Einblick in den Metabolismus von *C. difficile* zu gewinnen. Da für die Kultivierung im Minimalmedium MDM hochwertigere Daten zur OD<sub>600</sub> als zur Biosynthese des Exopolysaccharids vorlagen, wurde das Modell iHD992 auf die Sekretion des Polysaccharids optimiert und das Wachstum basierend auf Labordaten festgelegt. Abbildung 3.12 zeigt die Verhältnisse der Sekretion des Polysaccharids zur Glucoseaufnahme und zur Produktion von BTM während der linearen Wachstumsphase in MDM.



**Abbildung 3.12: Zeitaufgelöste Simulation der Exopolysaccharidproduktion in MDM.** Blau: vorhergesagtes molares Verhältnis der Produktionsrate von Exopolysaccharid-Zuckern zur Glucose-Aufnahmerate (PS/Gluc); orange: Lineare Anpassung PS/Gluc ohne Intervall von 5,25 bis 6,75 h ( $R^2$ : 0,98806); grün: vorhergesagtes Verhältnis der Sekretionsrate von Kohlenstoff als Polysaccharid zur Kohlenstoff-Einbaureate in die Biomasse (PS/BTM).

Das Modell sagt eine lineare Verringerung des Verhältnisses zwischen der Produktionsrate der Exopolysaccharid-Zucker und der Glucose-Aufnahmerate vorher. So sinkt

das Verhältnis von 0,89 bei 0,75 h auf 0,40 bei 8,0 h. Dieser Trend ist zwischenzeitlich unterbrochen durch eine Phase zwischen 5,0 und 7,0 h, in der zwischenzeitlich mehr Glucose für die Biosynthese des Exopolysaccharids verwendet als in die Zellen importiert wird. Das Modell sagt außerdem vorher, dass 76 % der bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,15 aufgenommenen Glucose zu Exopolysaccharid-Zuckern umgewandelt wurde. Die entspricht dem experimentell bestimmten Wert von  $0,73 \pm 0,05$  (siehe Tabelle 3.8) bei dieser OD<sub>600</sub>. Bei der OD<sub>600</sub> von 0,22 hingegen sagt das Modell mit 0,81 statt  $0,72 \pm 0,03$  ein etwas höheres Verhältnis voraus als das Experiment. Dies könnte an der von Neumann-Schaal *et al.* [102] beobachteten Sekretion von Alanin und den zusätzlichen Kosten durch die mögliche Resekretion aufgenommener Aminosäuren (siehe Kapitel 3.5.3) liegen.

Ein Wechsel zwischen Glycolyse und Gluconeogenese wurde *in vivo* und *in silico* nachgewiesen. In Kapitel 3.4.1 wurde gezeigt, dass etwa 40 % des Glucose-6-phosphats bei der OD<sub>600</sub> von 0,220 aus der Gluconeogenese stammen. Das Modell bildet dies relativ genau ab und sagt einen Anteil von 45 % bei 5,75 h voraus, was einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,22 entspricht.

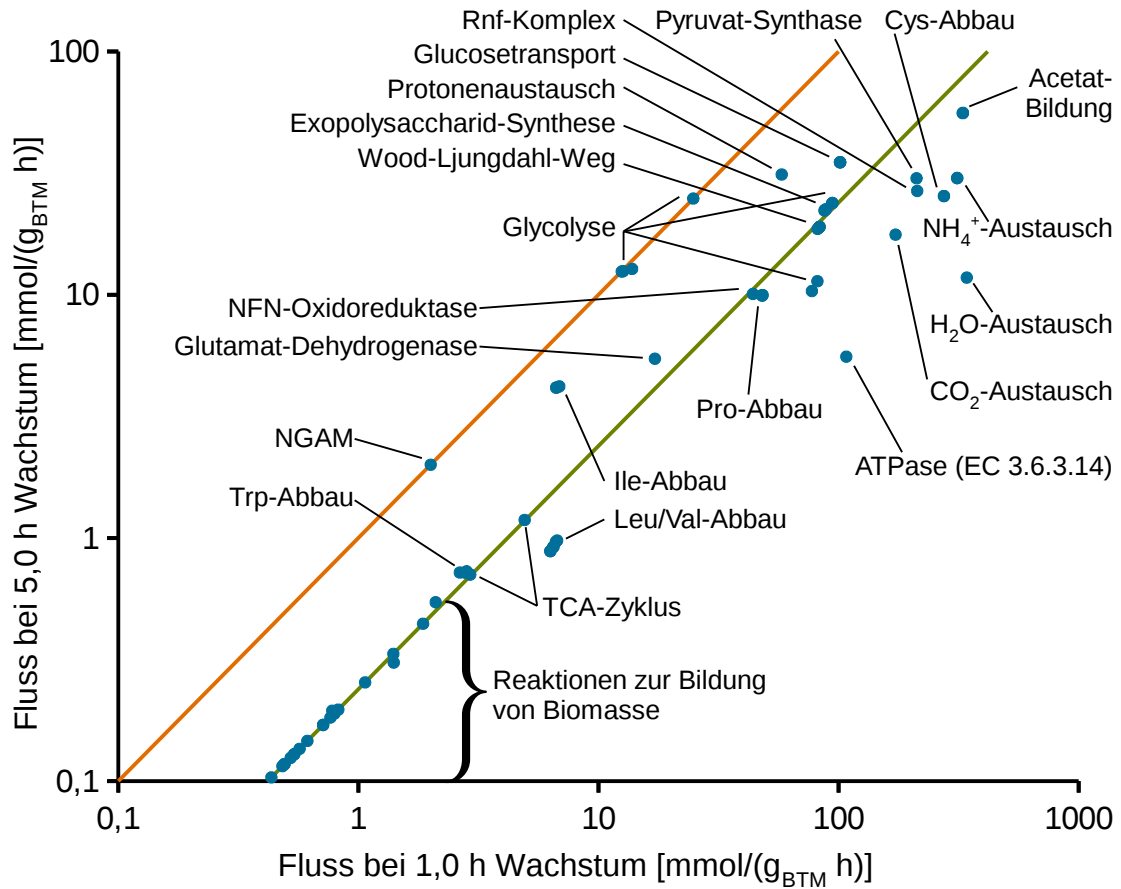
#### 3.5.1 Wachstumsassoziierte Exopolysaccharidsekretion

Das durch das Modell vorhergesagte Verhältnis der Sekretionsrate von Kohlenstoff als Polysaccharid zur Kohlenstoff-Einbaurrate in die Biomasse (Abbildung 3.12) ist in etwa konstant bei 13,1 bis 5,0 h Wachstum. Nach der darauf folgenden massiven Änderung des Metabolismus ist das Verhältnis konstant bei etwa 2,6 bis zum Ende der linearen Wachstumsphase nach 8,0 h Wachstum, in der der Zuwachs der Biomasse konstant ist. Konstante Verhältnisse zwischen Produktbildung und Steigerung der Biomasse bedeuten eine wachstumsassoziierte Produktbildung, was wiederum auf die Bildung einer Schleimkapsel oder eines Biofilms hindeutet. Die Bildung einer Schleimkapsel [309] als auch eines Biofilms [310] wurden bereits bei verschiedenen Stämmen von *C. difficile* beobachtet. Außerdem führt Schütteln und Rühren zur Inhibition des Wachstums (persönliche Mitteilung von Meina Neumann-Schaal). Davies und Borriello [309] konnten zeigen, dass die Schleimkapsel von *C. difficile* fragil ist, womit die Wachstumsinhibition erklärt werden könnte: Durch die Scherkräfte beim Schütteln oder Rühren wird das Exopolysaccharid von den Zellen gelöst. In Folge produziert *C. difficile* neues Polysaccharid statt zu wachsen.

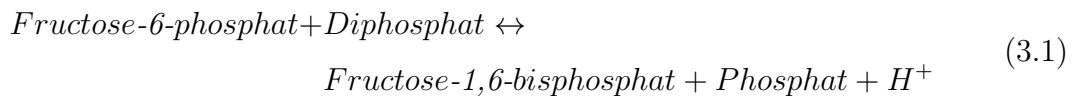
### 3.5.2 Die Aktivität der Glycolyse ist konstant

Um die Phase linearen Wachstums mit wachstumsassoziiierter Bildung des Polysaccharids genauer zu untersuchen wurden die Reaktionsflüsse bei 1,0 h und 5,0 h Wachstum verglichen (Abbildung 3.13). Im Gegensatz zum ungehemmten exponentiellen Wachstum, bei dem alle Flüsse konstant sind, führt ein lineares Wachstum zu einem logarithmischen Abfall der Wachstumsrate (vgl. Abbildung A.2). Ein Großteil der im MDM aktiven Reaktionen in *i*HD992 korreliert, wie auch die Biosynthese des Exopolysaccharids, direkt mit der Biomasseproduktion, da sie für die Biomasse benötigte Metabolite bereitstellen. Dazu gehört auch die NADH-abhängige Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase (NFN-Oxidoreduktase), die mittels NADH und Ferredoxin zwei Moleküle  $\text{NADP}^+$  zu NADPH reduziert und so das benötigte NADPH für den Anabolismus bereitstellt. Außerdem skalieren die Aktivitäten der Enzyme des Wood-Ljungdahl-Wegs, der reduktiv aus Formiat,  $\text{CO}_2$  und CoA Acetyl-CoA erzeugt, mit der Synthese der Biomasse. Die Stickland-Abbauwege der Aminosäuren sind aufgrund des sequenziellen Abbaus der Aminosäuren während der Kultivierung nicht an die Biomasseproduktion gekoppelt. Ein extremes Beispiel hierfür ist der Abbau von Methionin, das am Anfang der Kultivierung in großen Mengen aufgenommen wurde, sodass es schon bei 4,67 h Wachstum nicht mehr in der Kultur detektiert werden konnte [102].

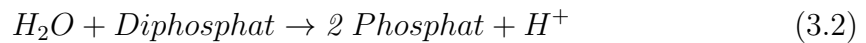
Trotz des linearen Wachstums und der damit verbundenen logarithmischen Verringerung der Wachstumsrate und der meisten Reaktionsflüsse gibt es einige Reaktionen, deren Aktivität in Modell bei 1,0 h und 5,0 h Wachstum gleich ist. Hier wäre die NGAM zum erwähnen, welche sämtlichen Energieaufwand vereinfacht in Form von ATP-Hydrolyse darstellt, der zur Erhaltung und Reparatur des Organismus notwendig ist, und daher nicht an das Wachstum gekoppelt ist. Außerdem ist die Aktivität der meisten Reaktionen der Glycolyse zu beiden Zeitpunkten des Wachstums nahezu identisch. Nur zwei Reaktionen der Glycolyse weichen von diesem Muster ab: die Phosphorylierung von Fructose-6-phosphat mit Diphosphat und die Generierung von Pyruvat durch die Phosphorylierung von ADP mittels Phosphoenolpyruvat. Erstere wird durch die Fructose-6-phosphat-1-Phosphotransferase katalysiert (EC 2.7.1.90, Formel 3.1) und ist in den betrachteten FBA-Lösungen wachstumsgekoppelt.



**Abbildung 3.13: Beträge der stärksten Reaktionsflüsse in MDM.** Verglichen werden die Vorhersagen des Modells *i*HD992 bei 1,0 h und 5,0 h Wachstum. Blau: Reaktionsflüsse; orange: Flüsse konstant; grün: Flüsse wachstumsgekoppelt.



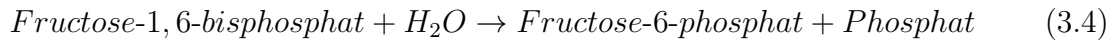
Diphosphat entsteht bei diversen Biosynthesen als Nebenprodukt und kann im Modell *i*HD992 alternativ nur noch hydrolysiert werden (EC 3.6.1.1, Formel 3.2).



Aktiv ist die Fructose-6-phosphat-1-Phosphotransferase bei einer optimalen FBA in jedem Fall, da die einzige Alternative die entsprechend metabolisch teurere Phosphorylierung mit ATP (EC 2.7.1.11, Formel 3.3) ist. Da mehr Diphosphat produziert als



für die Glycolyse benötigt wird, kann der Überschuss entweder direkt hydrolysiert werden (Formel 3.2) oder für die Phosphorylierung von Fructose-6-phosphat (Formel 3.1) verwendet werden, welches dann als Fructose-1,6-bisphosphat dephosphoryliert wird (EC 3.1.3.11, Formel 3.4). Letzteres entspricht der hier betrachteten FBA-Lösung.

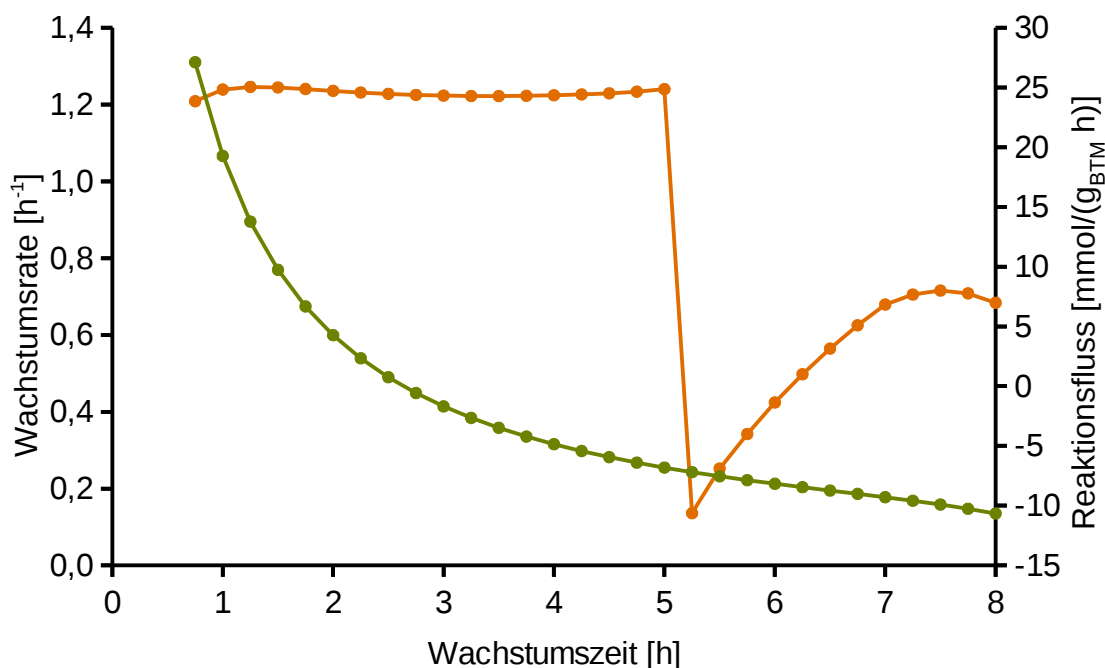


Die ebenfalls optimale FBA-Lösung mit der direkten Hydrolyse des überschüssigen Diphosphats würde zur gleichen Aktivität der Fructose-6-phosphat-1-Phosphotransferase zu beiden Zeitpunkten führen.

Die zweite Reaktion der Glycolyse, die bei 1,0 h und 5,0 h Wachstum im Modell nicht die gleiche Aktivität zeigt, ist die Generierung von Pyruvat durch die Phosphorylierung von ADP mittels Phosphoenolpyruvat (EC 2.7.1.40). In Konkurrenz zu dieser Reaktion steht die Phosphorylierung des Phosphotransferasesystems (EC 2.7.3.9), das Glucose in die Zelle importiert und dabei zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert (EC 2.7.1.199). Würde sämtliches Glucose-6-phosphat die Glycolyse durchlaufen, würde entsprechend die Hälfte des Phosphoenolpyruvats für den Glucoseimport benötigt. Im hier vorliegenden Fall verändert sich das Verhältnis der Glucose, die durch die Glycolyse verstoffwechselt wird, und der Glucose, die für die Synthese von Zuckerderivaten verwendet wird, sodass die Aktivität der Pyruvat-Kinase (EC 2.7.1.40) weder konstant noch wachstumsgekoppelt ist.

Abbildung 3.14 zeigt sowohl die Wachstumsrate als auch exemplarisch die vorhergesagte Aktivität der Phosphoglycerat-Kinase (EC 2.7.2.3) von *C. difficile* 630 $\Delta$ erm während des linearen Wachstums in MDM. Im Gegensatz zur Wachstumsrate und damit auch allen Reaktionen, die zur Bildung von Bestandteilen der Biomasse beitragen, fällt die Aktivität der Phosphoglycerat-Kinase nicht logarithmisch, sondern ist bis 5,0 h Wachstum konstant bei etwa 24,5 mmol/(g<sub>BTM</sub> h). Daraufhin folgt eine Phase negativen Flusses. Dies entspricht einer Umkehrung der Reaktionsrichtung und somit einer aktiven Gluconeogenese. Dies ist notwendig, da zwischen 5,0 h und 6,0 h Wachstum mehr Exopolysaccharid-Zucker produziert werden als Glucose aufgenommen wird (siehe Abbildung 3.12). Zum Ende der linearen Wachstumsphase dreht

sich die Reaktionsrichtung wieder um und erreicht einen Fluss von  $8,0 \text{ mmol}/(\text{g}_{\text{BTM}} \text{ h})$  bei 7,5 h Wachstum.



**Abbildung 3.14: Konstanter Fluss trotz linearem Wachstum.** Zeitaufgelöste Simulation von *C. difficile* 630 $\Delta_{erm}$  in MDM. Grün: Wachstumsrate basierend auf experimentellen Daten (siehe Kapitel 2.6); orange: vorhergesagter Reaktionsfluss katalysiert durch die Phosphoglycerat-Kinase (EC 2.7.2.3) bezogen auf 1 g BTM.

Lineares Wachstum kann entweder durch eine konstante Zufuhr eines essentiellen Metaboliten wie beispielsweise der Kohlenstoffquelle oder die konstante Aktivität eines einzelnen Enzyms durch die Limitierung eines benötigten Cofaktors (z. B. Vitamin B12) hervorgerufen werden [311]. Da mit *C. difficile* eine anaerobe Batch-Kultivierung durchgeführt wurde und alle Substrate vollständig im Medium gelöst waren, kann der erste Fall ausgeschlossen werden. Die Reaktion zu identifizieren, die letztendlich das Wachstum begrenzt, ist schwierig, da alle anderen Reaktionen, die zur Generierung von Biomasse-Bestandteilen beitragen, sich analog zu dieser verhalten (vgl. Abbildung 3.13). *C. difficile* 630 $\Delta_{erm}$  wächst in CDMM, das sich nur durch zusätzliche Aminosäuren von MDM unterscheidet, exponentiell (siehe Kapitel 3.6). Dies legt nahe, dass die Limitierung des Biosynthesewegs einer Aminosäure der Grund für das lineare Wachstum darstellt. Die konstante Aktivität der Glycolyse ist trotzdem bemerkenswert: Da während der gesamten linearen Wachstumsphase

Glucose aufgenommen (siehe Tabelle A.10) und das Exopolysaccharid in großen Mengen produziert wird (siehe Abbildung 3.12), muss Glucose-6-phosphat in der Zelle vorhanden sein. Die konstante Aktivität der Enzyme der Glycolyse während der ersten Hälfte der linearen Wachstumsphase ist somit erklärbar durch die konstitutive Präsenz dieser Enzyme, die nahezu am Maximum ihrer möglichen Aktivität arbeiten.

### 3.5.3 Die Sekretion von Alanin

Nach der metabolischen Veränderung nach 5,0 h Wachstum von *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* in MDM ist die Aufnahme von Aminosäuren stark erhöht und Alanin wird in das Medium sekretiert [102]. Das Modell favorisiert die Degradation von Alanin gegenüber dessen Sekretion zu jedem Zeitpunkt des Wachstums in MDM. Die Sekretion von Alanin könnte somit nur ein Nebeneffekt sein: Nach 5,0 h Wachstum ist die Glucoseaufnahme verringert und die Aufnahme der Aminosäuren Prolin, Leucin und Valin stark erhöht (siehe Tabelle A.10). Für den Abbau der verzweigten Aminosäuren über Stickland-Reaktionen müssen diese zuerst desaminiert werden, wodurch 2-Oxoglutarat mittels der Transaminase für verzweigte Aminosäuren (EC 2.6.1.42) zu L-Glutamat aminiert wird. Das Modell sagt dann eine Desaminierung des L-Glutamats durch die Glutamat-Dehydrogenase (EC 1.4.1.2) vorher. Entsprechend bedeutet eine erhöhte Aufnahme von Leucin und Valin einen höheren Bedarf an Glutamat-Dehydrogenase-Aktivität, der möglicherweise nicht sofort erfüllt werden kann. Um die notwendige Menge an 2-Oxoglutarat regenerieren zu können, werden stattdessen andere 2-Oxosäuren aminiert und sekretiert. Die Oxosäuren mit dem stärksten Umsatz sind Pyruvat und die Oxosäuren der im MDM vorkommenden Aminosäuren, die für den Abbau transaminiert werden. Wenn diese Oxosäuren aminiert und die entstehenden Aminosäuren sekretiert werden, kann dies nur für Alanin, dessen Oxosäure Pyruvat ist, festgestellt werden, da sich für alle anderen Aminosäuren nur der Nettofluss verringern würde.

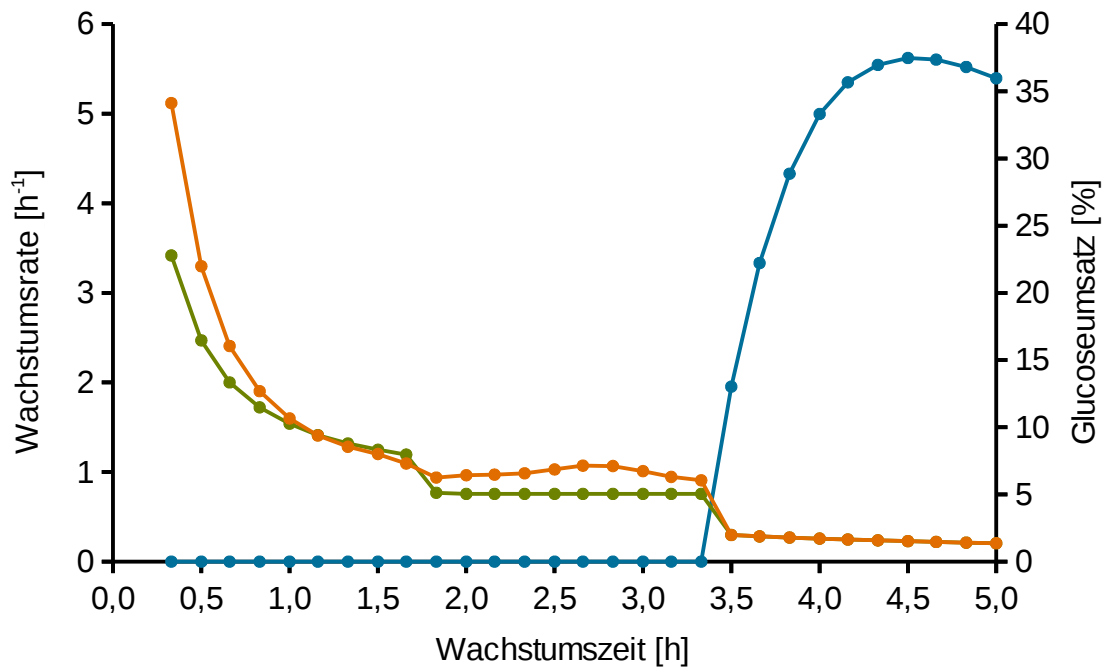
## 3.6 *Clostridioides difficile* 630 $\Delta$ *erm* in CDMM

Abgesehen von Wachstumsdaten in Minimalmedium MDM sind auch Daten zum Wachstum von *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* in CDMM verfügbar [102], das statt 7 Aminosäuren Casein-Hydrolysat enthält. Ein besseres Verständnis des Wachstums in diesem Medium ist deshalb interessant, da *C. difficile* in CDMM deutlich größere Mengen an Toxin A und B bildet [102].

Da während der frühen Wachstumsphase in CDMM kein Exopolysaccharid detektiert werden konnte (siehe Tabelle 3.8), wurde die Maximierung der Biomasseproduktion als Zielfunktion verwendet. Nach der Änderung des Metabolismus nach 3,5 h Wachstum, die mit einer erhöhten Glucoseaufnahme verbunden ist (vgl. Tabelle A.11), wurde die Maximierung der Sekretion des Exopolysaccharids als Zielfunktion gesetzt. Die vom Modell vorhergesagten Wachstumsraten entsprechen in etwa denen, die von experimentellen Daten abgeleitet wurden (Abbildung 3.12). Zwischen 1,5 h und 3,33 h beträgt die Wachstumsrate im Modell relativ konstant  $1,0 \text{ h}^{-1}$ , was für eine exponentielle Wachstumsphase spricht. Dies konnte aufgrund der großen Unterschiede zwischen den biologischen Replikaten und einer deswegen fehlerbehafteten Wachstumskurve (siehe Abbildung A.3) nicht eindeutig experimentell gezeigt werden. Das Modell sagt außerdem voraus, dass 33 %, der bis 4 h Wachstum importierten Glucose, im Exopolysaccharid gebunden sind. In Übereinstimmung damit betrug der entsprechende experimentelle Wert  $36 \pm 3 \%$  (vgl. Tabelle 3.8) .

### 3.6.1 Bildung von organischen Säuren

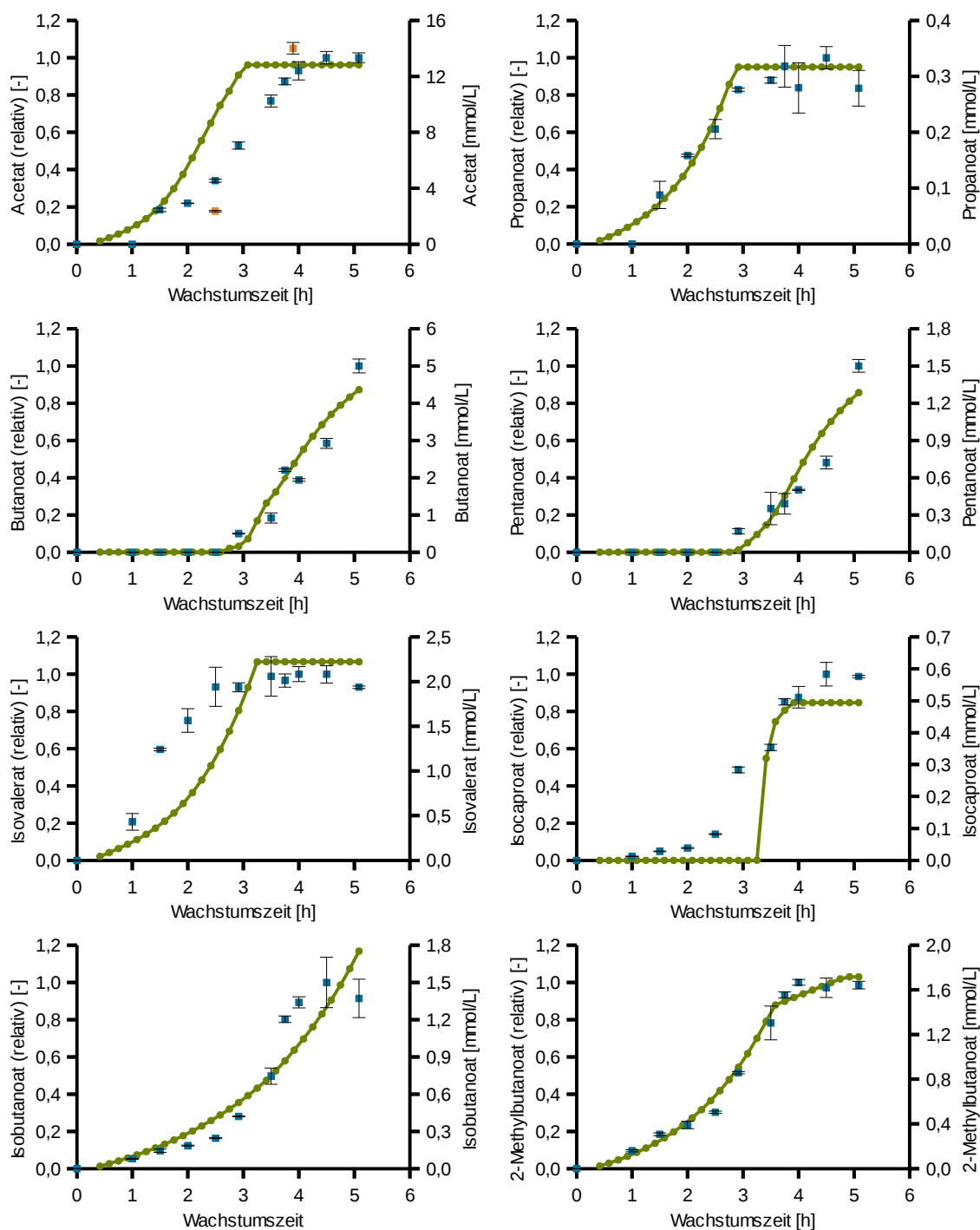
Die durch das Modell vorhergesagten Konzentrationen der linearen Alkansäuren sind im Wesentlichen mit den *in vivo*-Daten kompatibel (Abbildung 3.16). Nach 3,0 h Wachstum wird die Produktion von Acetat und Propanoat unterbrochen und die Produktion von Butanoat und Pentanoat gestartet. Dies führt *in silico* zu einer finalen Acetatkonzentration von 12,82 mmol/L und ist damit nahe an den  $14,01 \pm 0,41 \text{ mmol/L}$  des Laborexperiments (Tabelle 3.8). Im Unterschied zum Modell steigt *in vivo* die Acetat-Konzentration (bestimmt mit GC/MS [102]) bis etwa 4,0 h Wachstum an, was an einer verzögerten Sekretion des Acetats liegen könnte. Hinzu kommt, dass die Ergebnisse der Quantifizierung mittels Enzymassay (Tabelle 3.8) weder mit den GC/MS-Daten noch mit der Simulation kompatibel sind. Allerdings



**Abbildung 3.15: Zeitaufgelöste Simulation von *C. difficile* 630 $\Delta_{erm}$  in CDMM.** Grün: Wachstumsrate basierend auf experimentellen Daten (siehe Kapitel 2.6); orange: vom Modell vorhergesagte Wachstumsrate; blau: Vorhergesagter Anteil der aufgenommenen Glucose, die zu Exopolysaccharid-Zuckern umgewandelt wurden.

wurden für die Kultivierungen unterschiedliche Chargen von Casein-Hydrolysat verwendet, weshalb die Kultivierungsbedingungen nicht gleich waren.

Leucin wird *in vivo* und *in silico* zuerst mittels des oxidativen und dann mittels des reduktiven Stickland-Wegs degradiert. Im Modell tritt dieser Übergang bei 3,0 h Wachstum auf, wohingegen *in vivo* schon nach 2,0 h eine signifikante Produktion von Isocaproat beobachtet wurde [102]. Der Grund für dieses Verhalten ist mit dem auf maximale Biomasseproduktion optimierten Modell nicht zu erklären und ist auch überraschend, da zu diesem Zeitpunkt alle anderen Substrate (z. B. Glucose) soweit möglich noch oxidativ verstoffwechselt werden. Eine hohe Übereinstimmung zeigt sich hingegen zwischen den durch das Modell vorhergesagten Konzentrationen von Isobutanoat sowie 2-Methylbutanoat und den gemessenen relativen Konzentrationen. Die beiden korrespondierenden Aminosäuren Valin und Isoleucin können nur über oxidative Stickland-Wege abgebaut werden. Die hohe Übereinstimmung zeigt somit erneut, dass die hier verwendete Methode der DFBA in Kombination mit der verwendeten Analytik plausible Ergebnisse liefern kann.



**Abbildung 3.16: Produktion von Alkansäuren *in silico* und *in vivo*.** Zur Vereinfachung wurde im Modell die Bildung von Alkansäuren vor 0,4 h Wachstum vernachlässigt. Blau: relative Konzentration (GC/MS) [102]; orange: absolute Konzentration (Assay); grün: vom Modell *i*HD992 vorhergesagte Konzentration.

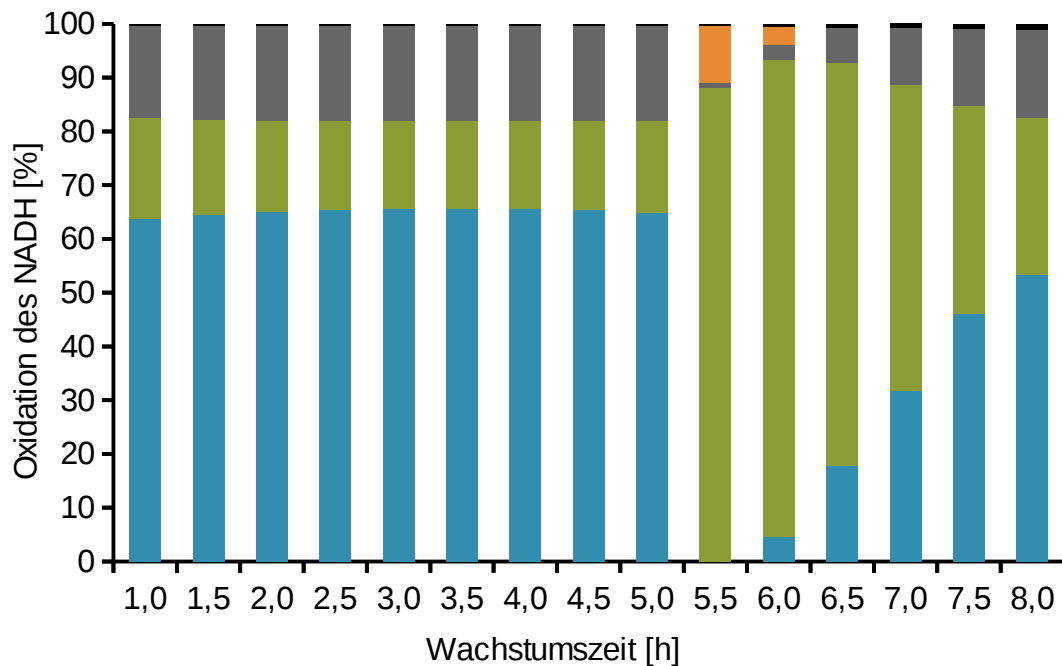
## 3.7 Energie- und Redox-Metabolismus

Ein metabolisches Modell, das zur Simulation quantitativen Wachstums fähig ist, ermöglicht den Energiemetabolismus des Organismus zu analysieren und so besser zu verstehen. Im Folgenden soll nun die Rolle des Wood-Ljungdahl-Wegs im Redox-Metabolismus sowie der ATP-Metabolismus genauer untersucht werden. Außerdem wird der Einfluss der Stöchiometrie der ATP-Synthase auf die Bildung organischer Säuren diskutiert.

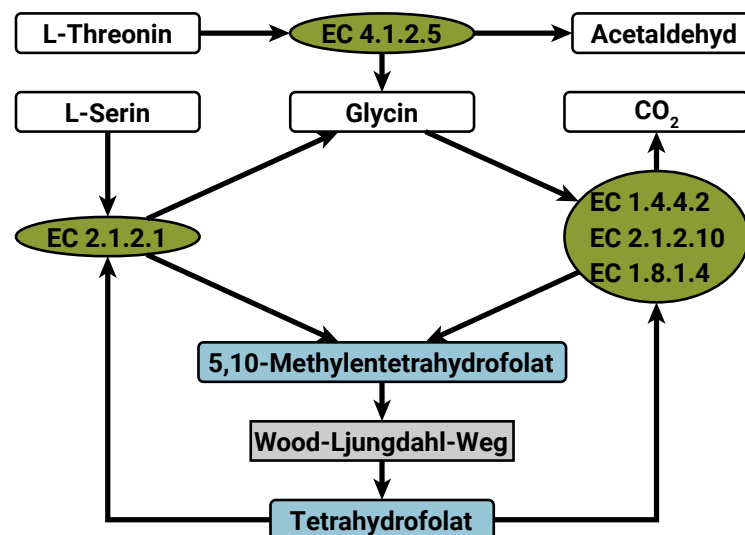
### 3.7.1 Die Rolle des Wood-Ljungdahl-Wegs

Unter nicht-einschränkenden Bedingungen sagt das Modell *i*HD992 vorher, dass Glucose, die nicht für die Exopolysaccharid-Produktion verwendet wird, zu Acetat oxidiert wird. Aminosäuren werden, soweit möglich, über oxidative Stickland-Wege degradiert und reduktive Stickland-Wege werden nur für Aminosäuren ohne einen oxidativen Abbauweg (z. B. Prolin) verwendet. Das in großen Mengen entstehende NADH wird in MDM fast ausschließlich durch die NFN-Oxidoreduktase, die D-Prolin-Reduktase und den Wood-Ljungdahl-Weg oxidiert (siehe Abbildung 3.17). Die NFN-Oxidoreduktase reduziert parallel zur Oxidation von einem Ferredoxin und einem NADH zwei  $\text{NADP}^+$  zu NADPH und stellt so in *C. difficile* nahezu sämtliches NADPH für den Anabolismus bereit. Die D-Prolin-Reduktase (EC 1.21.4.1) ist Teil des reduktiven Stickland-Weges von Prolin und katalysiert die Reduktion von Prolin zu 5-Aminovalerat mittels NADH. Außerdem wird für einen kurzen Zeitraum während des Wachstums in MDM NADH für die Gluconeogenese (siehe Kapitel 3.5) benötigt.

Der nötige Kohlenstoff, um Tetrahydrofolat für den Wood-Ljungdahl-Weg zu beladen, kann im Modell *i*HD992 (abgesehen von Formiat, siehe Kapitel 1.2.3) aus den drei Aminosäuren Threonin, Glycin und Serin gewonnen werden (Abbildung 3.18). Threonin wird mittels der L-Threonin-Aldolase (EC 4.1.2.5) in Acetaldehyd und Glycin gespalten. Der Glycin-Decarboxylase-Komplex (EC 1.4.4.2, 2.1.2.10 und 1.8.1.4) überträgt eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe des Glycins auf Tetrahydrofolat unter Produktion von Ammonium und  $\text{CO}_2$ . Außerdem wird Tetrahydrofolat während der Umwandlung von Serin zu Glycin durch die Glycin-Hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1) beladen, was letztendlich sogar zu zwei 5,10-Methylenetetrahydrofolaten pro Serin führt.



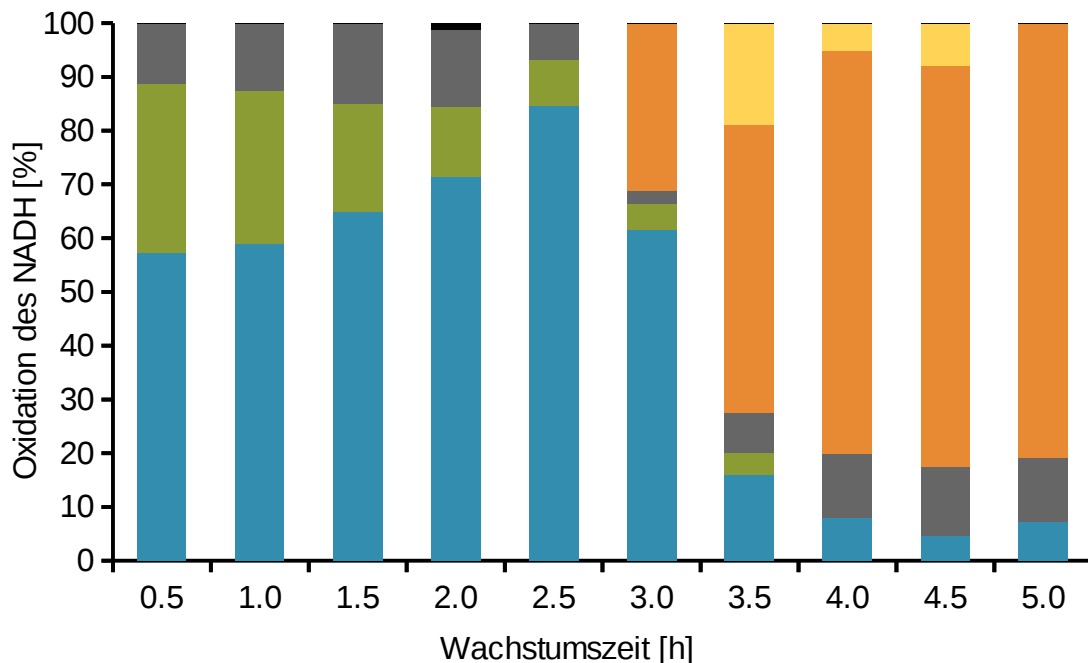
**Abbildung 3.17:** Die Oxidation von NADH in MDM. Blau: Wood-Ljungdahl-Weg; grün: D-Prolin-Reduktase (EC 1.21.4.1); grau: NFN-Oxidoreduktase; orange: Gluconeogenese; schwarz: sonstige Reaktionen.



**Abbildung 3.18:** Beladung von Tetrahydrofolat durch Aminosäuren in *iHD992*. Zur Vereinfachung werden nicht alle Substrate und Produkte gezeigt. Die Richtung der Pfeile zeigt die übliche Flussrichtung an. Blau: Folat-Derivate; weiß: andere Metabolite; grau: Stoffwechselwege; grün: Reaktionen.



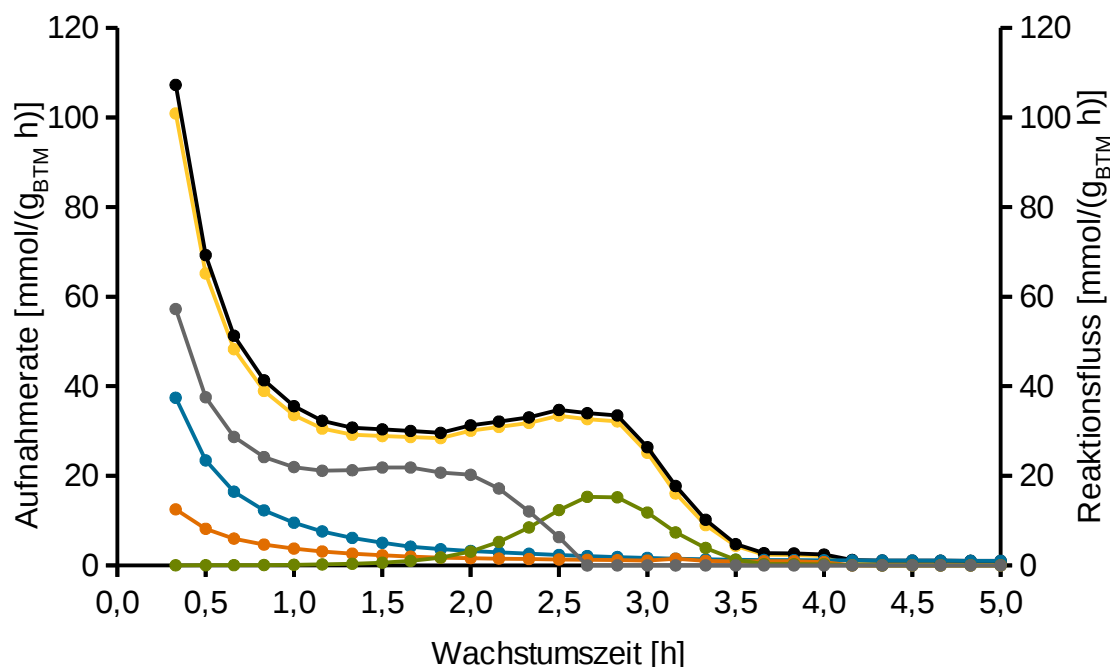
Solange 5,10-Methylenetetrahydrofolat vorhanden ist, benutzt *C. difficile* den Wood-Ljungdahl-Weg als primären Elektronenakzeptor. Eine Ausnahme hierbei bildet das Wachstum in CDMM nach 3,0 h Wachstum (Abbildung 3.19), wenn keine der drei 5,10-Methylenetetrahydrofolat-regenerierenden Aminosäuren mehr in ausreichender Menge zur Verfügung steht und der Weg, um mittels Formiat Tetrahydrofolat zu beladen, blockiert ist. Hierbei ist zu erwähnen, dass im Modell künstlich die Methylenetetrahydrofolat-Dehydrogenase ( $\text{NADP}^+$ , EC 1.5.1.5) nach 2,5 h Wachstum deaktiviert werden musste (vgl. Kapitel 2.7). Der Grund für die Inaktivität des Weges *in vivo* ist unbekannt, aber notwendig um eine Produktion von linearen Alkansäuren (siehe Kapitel 3.6.1) zu erreichen.



**Abbildung 3.19: Die Oxidation von NADH in CDMM.** Blau: Wood-Ljungdahl-Weg; grün: D-Prolin-Reduktase (EC 1.21.4.1); grau: NFN-Oxidoreduktase; orange: Produktion linearer Alkansäuren; gelb: Stickland-Reaktionen; schwarz: sonstige Reaktionen.

Zwischen 1,5 h und 3,0 h Wachstum ist analog zur Wachstumsrate (Abbildung 3.15) auch die Aktivität des Acetyl-CoA-Synthase-Komplexes konstant (Abbildung 3.20). Der Ursprung des 5,10-Methylenetetrahydrofolats variiert hingegen im Laufe der Kultivierung: Bei 0,33 h Wachstum stammen 47 % aus den Aminosäuren, deren Anteil bis auf 27 % bei 1,66 h Wachstum abnimmt. Ab diesem Zeitpunkt steigt die Aufnahme

des Serins, wodurch nahezu der gesamte Bedarf an 5,10-Methylenetetrahydrofolat durch Beladung von Tetrahydrofolat während der Degradation von Serin gedeckt werden kann.



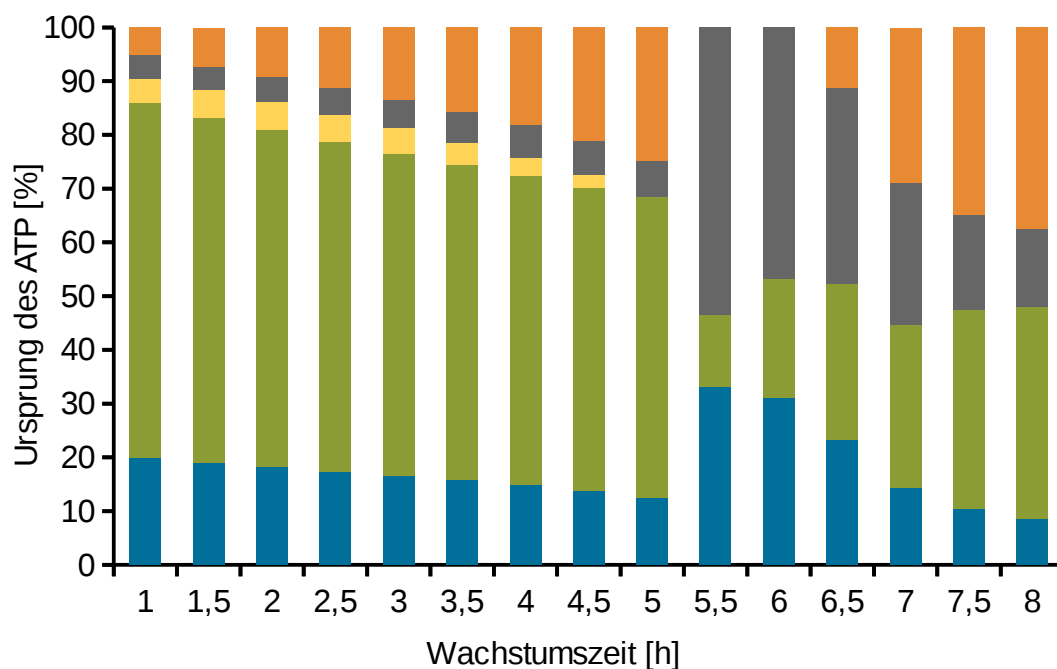
**Abbildung 3.20: Der Wood-Ljungdahl-Weg in CDMM.** Aminosäure-Aufnahmeraten basieren auf experimentellen Daten (siehe Kapitel 2.6). Schwarz: vorhergesagte maximale Verfügbarkeit von Methylentetrahydrofolat; gelb: vorhergesagte Aktivität des Acetyl-CoA-Synthase-Komplexes (EC 2.3.1.169); blau: Threonin-Aufnahmerate; orange: Glycin-Aufnahmerate; grün: Serin-Aufnahmerate; grau: vorhergesagte Aktivität der Methylentetrahydrofolat-Dehydrogenase (EC 1.5.1.5).

Nachdem kein Serin mehr im Medium vorhanden ist, stehen bis zum Ende der linearen Wachstumsphase nur noch geringe Mengen Glycin und Threonin zu Verfügung. Der Großteil des NADH wird dann durch die Produktion von linearen Alkansäuren und die Aktivität reduktiver Stickland-Reaktionen oxidiert. Die Bedeutung des Wood-Ljungdahl-Wegs für *C. difficile* zeigt sich auch phänotypisch: Neben Gallensäuren (siehe Kapitel 3.1.10) führt auch Glycin zum Auskeimen von Sporen [44].

### 3.7.2 Generierung von ATP

Organismen benötigen Energie in Form von ATP für die Produktion von Biomasse und Sekundärmetaboliten, aber auch für den Transport von Metaboliten durch die Membran, Motilität und Reparaturvorgänge. Die Phosphorylierung von Nucleosiddiphosphaten zu Nucleosidtriphosphaten, zu denen auch ATP gehört, kann durch Substratkettenphosphorylierung oder durch Nucleosidtriphosphat-Synthasen (z. B. ATP-Synthasen) geschehen.

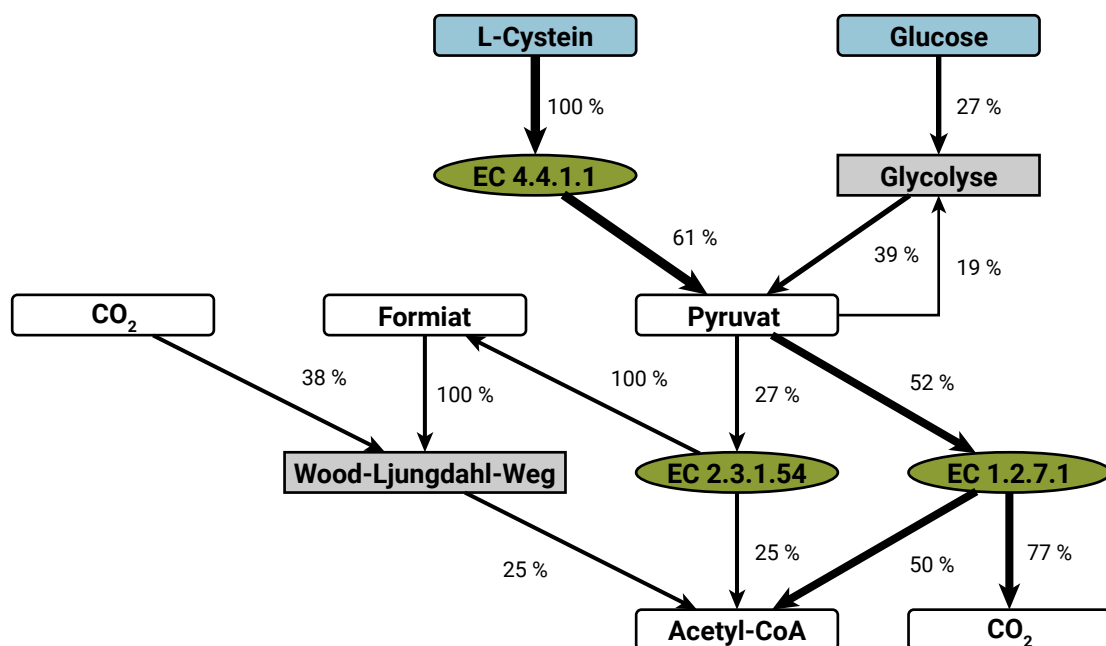
Da ATP eine so zentrale Rolle im Metabolismus von Organismen einnimmt, ist die quantitative Ermittlung dessen Ursprungs von großer Bedeutung, um den Organismus zu verstehen. Im Gegensatz zu experimentellen Methoden kann mittels metabolischer Modellierung leicht die Herkunft des ATP bestimmt werden. Der Ursprung des ATP im Modell *i*HD992 bei Wachstum in MDM ist in Abbildung 3.21 gezeigt.



**Abbildung 3.21: Ursprung des ATP bei Wachstum in MDM.** Blau: ATP-Synthase; grün: Acetat-Produktion; gelb: Propanoat-Produktion; grau: weitere oxidative Stickland-Reaktionen; orange: Glycolyse.

Da die Aktivität der Glycolyse bis zu einer Wachstumszeit von 5 h bei linearem Wachstum nahezu konstant ist (vgl. Kapitel 3.5.2), steigt der Anteil des während der Glycolyse gebildeten ATP stetig an. Kleinere Mengen ATP werden außerdem durch

die ATP-Synthase sowie oxidative Stickland-Wege von Methionin (mit Propanoat als Produkt), Tryptophan und der verzweigtkettigen Aminosäuren gebildet. Der größte Teil des ATP wird bei der Bildung von Acetat produziert, wobei das Acetyl-CoA entweder im Wood-Ljungdahl-Weg produziert oder durch die Pyruvat-Synthase (EC 1.2.7.1) sowie die Formiat-C-Acetyltransferase (EC 2.3.1.54) aus Pyruvat gebildet wird. Abbildung 3.22 zeigt beispielhaft den Ursprung des Acetyl-CoA bei 3 h Wachstum in MDM.

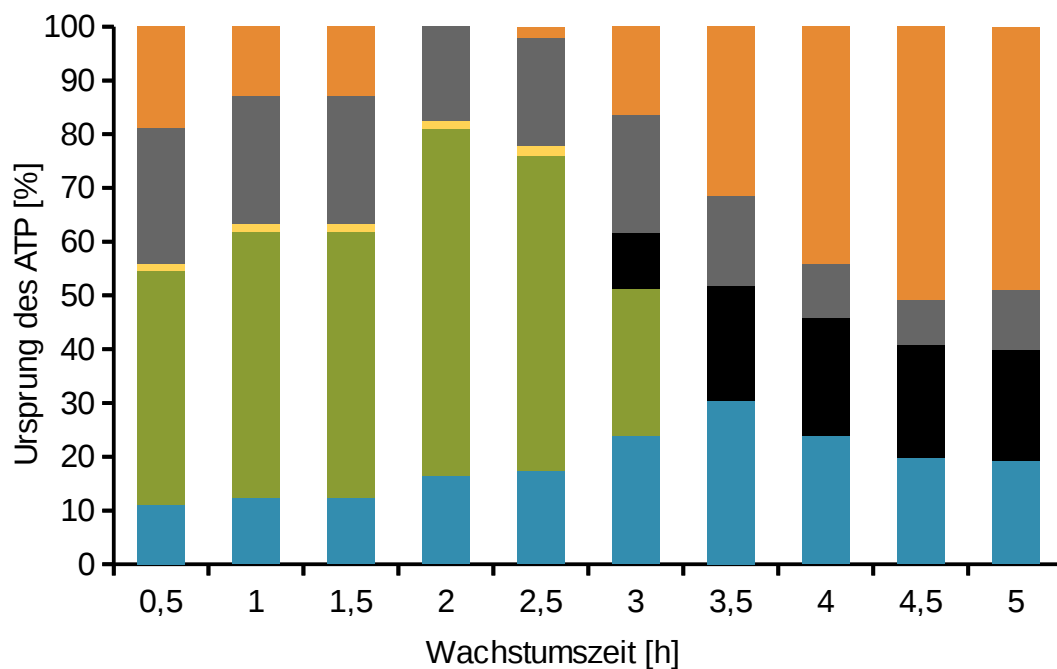


**Abbildung 3.22: Bildung von Acetyl-CoA bei 3 h Wachstum in MDM.** Zur Vereinfachung werden nicht alle Substrate und Produkte gezeigt. Die Dicke des Pfeils gibt die ungefähre Stärke des Flusses an. Die Zahlen an den Pfeilen geben den Anteil des Flusses am Gesamtfluss zum/vom Metaboliten an. Blau: Substrate; weiß: andere Metabolite; grün: Reaktionen; grau: Stoffwechselwege.

Nach der Umstellung des Metabolismus nach 5 h Wachstum nimmt die Bedeutung der Acetat-Produktion für die Generierung von ATP ab. Dies hat mehrere Gründe. Zum einen wird deutlich weniger Exopolysaccharid gebildet (siehe Kapitel 3.5), weshalb bei gleicher Wachstumsrate weniger ATP benötigt wird. Zum anderen wird statt Glycolyse Gluconeogenese betrieben. Dies führt direkt zu weniger Acetat aus Pyruvat und indirekt auch zu einer geringeren Aktivität des Wood-Ljungdahl-Wegs, da überschüssiges NADH für die Gluconeogenese verwendet wird. Außerdem ist die

Aufnahme der Aminosäuren erhöht, weshalb mehr ATP durch Substratkettenphosphorylierung in oxidativen Stickland-Wegen gebildet wird. Bis zum Ende der linearen Wachstumsphase bei 8 h Wachstum erhöht sich dann wieder der Anteil des ATP aus Acetat-Produktion und Glycolyse (siehe Abbildung 3.21).

Auch in CDMM wird anfangs ein großer Teil des ATP-Bedarfs durch die Produktion von Acetat gedeckt, wobei aber aufgrund des größeren Aminosäure-Angebots in CDMM die Phosphorylierung von ADP durch oxidative Stickland-Reaktionen einen größeren Anteil hat (Abbildung 3.23). Nach der Umstellung des Metabolismus nach etwa 3,5 h Wachstum, besonders hinsichtlich der Aktivität des Wood-Ljungdahl-Wegs (siehe Kapitel 3.7.1) und der Glucose-Aufnahmerate (siehe Kapitel 3.6), steigt der Anteil des durch Glycolyse erzeugten ATP an. Außerdem wird ADP bei der Synthese der linearen Alkansäuren Butanoat, Pentanoat und Hexanoat phosphoryliert.



**Abbildung 3.23: Ursprung des ATP bei Wachstum in CDMM.** Blau: ATP-Synthese; grün: Acetat-Produktion; gelb: Propanoat-Produktion; grau: weitere oxidative Stickland-Reaktionen; schwarz: Synthese von Butanoat, Pentanoat und Hexanoat; orange: Glycolyse.

#### 3.7.3 Stöchiometrie der ATP-Synthase

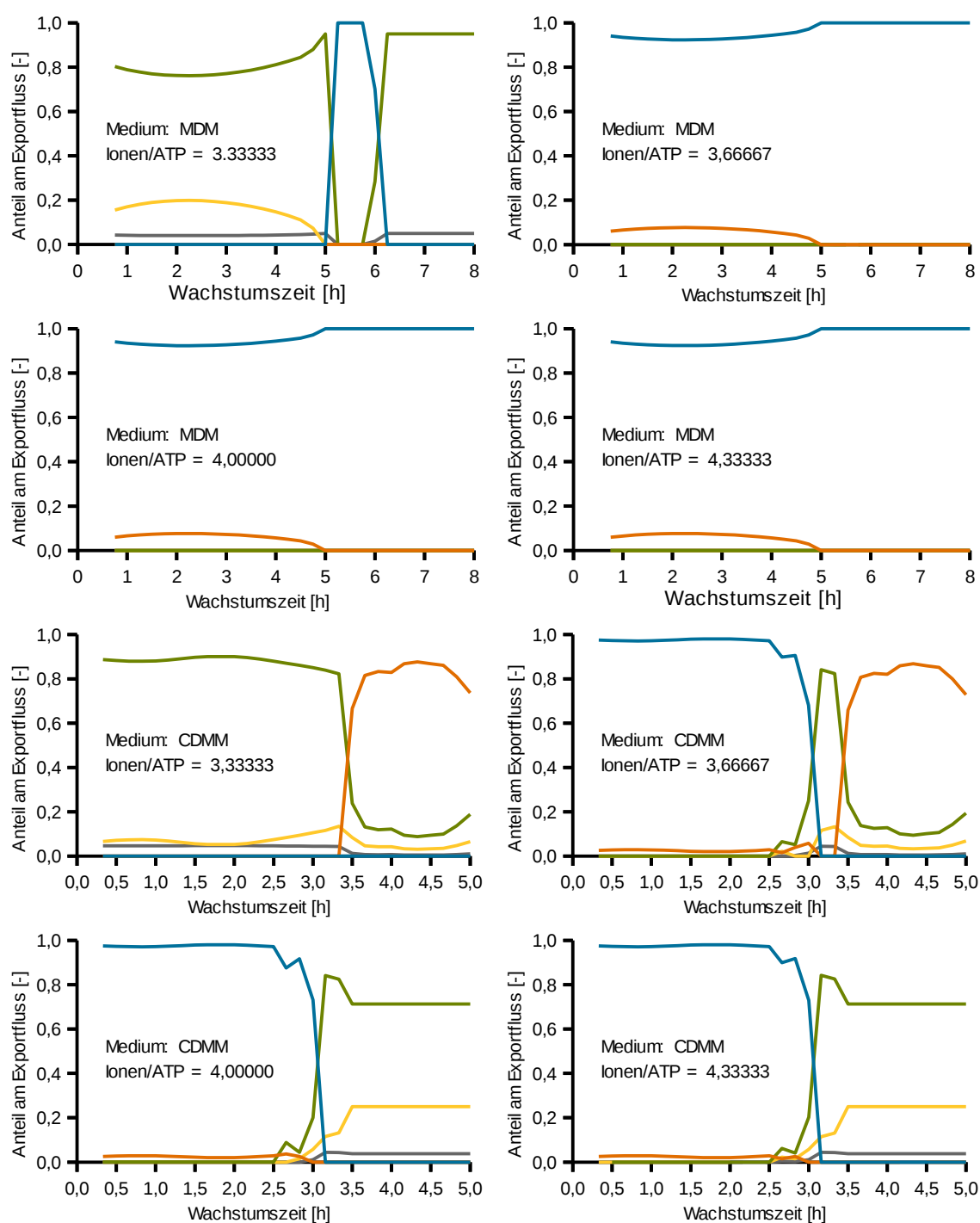
Um zu den zuvor präsentierten Simulationsergebnissen zu gelangen, wurden mit dem Modell *iHD992* diverse  $H^+$ /ATP- und  $Na^+$ /ATP-Verhältnisse für die ATP-Synthasen in *C. difficile* getestet (Abbildung 3.24). Die Anzahl der importierten Ionen pro drei Moleküle ATP entspricht hierbei der Anzahl der c-Untereinheiten des ATP-Synthase-Komplexes, weshalb nur diskrete Verhältnisse in  $1/3$ -Schritten möglich sind [312]. Neumann-Schaal *et al.* [102] konnten in MDM und in der exponentiellen Wachstumsphase in CDMM-Kulturen von *C. difficile* 630 $\Delta_{erm}$  kein Butanoat im Überstand detektieren. Entsprechend sagt die Simulation des Wachstums in MDM voraus, dass das Verhältnis von importierten Ionen zu ATP-Bildung mindestens bei  $11/3$  liegen muss (siehe Abbildung 3.24).

Das Modell sagt bei einem Verhältnis von  $11/3$  nach 3,5 h Wachstum in CDMM primär eine Produktion von Propanoat voraus. Neumann-Schaal *et al.* [102] konnten allerdings zeigen, dass zu diesem Zeitpunkt Propanoat nicht mehr in signifikanten Mengen sekretiert wird. Hierfür könnte es drei Gründe geben:

Erstens, der Organismus könnte diesen Weg umgehen, da das toxische Zwischenprodukt Acryloyl-CoA [313, 314] entsteht.

Zweitens, die Acryloyl-CoA-Reduktase könnte trotz ihres Aufbaus, der homolog zu diversen Ferredoxin-abhängigen Enzymen mit Elektronen-Bifurkation ist [111, 138, 182, 257], keine Elektronen-Bifurkation betreiben, wodurch der Stoffwechselweg energetisch weniger effizient wäre. Dies wurde von Buckel und Thauer [105] für die entsprechenden Enzyme von *C. propionicum* und *C. homopropionicum* postuliert, nachdem gezeigt werden konnte, dass die Acryloyl-CoA-Reduktase von *C. propionicum* *in vitro* zur Reduktion von Acryloyl-CoA mittels NADH ohne die Anwesenheit von Ferredoxin fähig ist [138]. Hierbei muss allerdings erwähnt werden, dass dies vor der ersten Charakterisierung der Enzyme mit Elektronen-Bifurkation des gleichen Aufbaus geschah [111, 138, 182, 257] und nicht ausschließt, dass die Acryloyl-CoA-Reduktase von *C. propionicum* *in vivo* Elektronen-Bifurkation betreiben kann.

Drittens, die Anzahl der durch den ATP-Synthase-Komplex transportierten Ionen pro ATP ist nicht  $3\frac{2}{3}$  sondern mindestens 4. Letztere Variante ist wahrscheinlich korrekt, da sonst kein Pentanoat nach 4 h Wachstum in CDMM produziert werden würde, da Propanoyl-CoA für Synthese von Pentanoat benötigt wird (vgl. Kapitel 3.6.1).



**Abbildung 3.24: Die ATP-Synthase von *C. difficile*.** Verhältnisse der *in silico*-Sekretionsraten von linearen Alkansäuren in MDM und CDMM bei verschiedenen  $\text{H}^+/\text{ATP}$ - und  $\text{Na}^+/\text{ATP}$ -Verhältnissen der ATP-Synthasen. Blau: Acetat; orange: Propanoat; grün: Butanoat; gelb: Pentanoat; grau: Hexanoat.

Bei einer weiteren Erhöhung der benötigten Ionen pro ATP konnte keine signifikante Änderung am Metabolismus festgestellt werden.

Die Anzahl der c-Untereinheiten des ATP-Synthase-Komplexes ist vom Organismus abhängig und kann nach derzeitigem Wissen 10 bis 15 betragen [315–320]. Dies entspricht  $3\frac{1}{3}$  bis 5 transportierten Ionen pro gebildetem ATP, wobei niedrigere Werte energetisch von Vorteil sind. Der Metabolismus von *C. difficile* ist vollständig auf Gärung ausgelegt, um ATP zu generieren. Gegenüber dem aeroben Stoffwechsel werden bei der Gärung nicht alle Kohlenstoffe vollständig oxidiert, was zu einer geringeren ATP-Ausbeute führt. Aufgrund dieses Handicaps wurde für die Modellierung des Stoffwechsels von *C. difficile* von 4 transportierten Ionen pro gebildetem ATP ausgegangen. Dies entspricht 12 c-Untereinheiten pro ATP-Synthase.



## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit umfasst die Reannotation des nosokomialen Pathogens *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* sowie die Generierung und Verwendung des genomweiten metabolischen Modells *i*HD992. Im Zuge der Reannotation wurde eine Reihe völlig neuer Stoffwechselwege vorhergesagt. Dies schließt zwei neue Abbauwege für die Aminosäuren 4-Hydroxyprolin und Histidin ein, für deren Existenz in Folge experimentelle Hinweise gewonnen werden konnten. Hier wurden insofern bedeutende Lücken geschlossen, als dass es bei beiden Aminosäuren zuvor Hinweise gab, dass sie über Stickland-Wege abgebaut werden, aber der genaue Weg unklar war [114, 267]. Außerdem konnten Gene für den Gallensäurenmetabolismus und die Resistenz gegen reaktive Sauerstoffspezies vorgeschlagen werden. Beide Stoffwechselwege sind medizinisch relevant, da sie mit dem Auskeimen von Sporen [44, 46, 321, 322] und der Infektion [49, 299, 323] assoziiert werden.

Die Reannotation ist insofern für die Forschung an *C. difficile* bedeutend, als dass die postulierten völlig neue Genfunktionen als Startpunkt für die Charakterisierung der entsprechenden Enzyme verwendet werden können. Die Reannotation ist aber auch wichtig für die Systembiologie: Genomics, Transcriptomics und Proteomics sind auf exakte Annotationen angewiesen um aussagekräftige Ergebnisse zu liefern.

Auf Basis der neuen Annotation konnte ein genomweites metabolisches Modell von *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* erstellt werden. Im Gegensatz zu dem zuvor von Larocque *et al.* [279] publizierten Modell von *C. difficile* 630, das nur für die Vorhersage von Targets für Medikamente verwendet wurde, ist das in dieser Arbeit präsentierte Modell in der Lage das quantitative Wachstum in zwei verschiedenen Medien zu simulieren. Erste FBAs zeigten ein *in silico* deutlich erhöhtes Wachstum im Vergleich zu *in vitro*. Viskoses Fließverhalten des Kulturüberstands und eine temporär aktive Gluconeogenese trotz im Medium verfügbarer Glucose deuteten auf die Synthese eines Exopolysaccharids hin. Im Genom konnte ein Operon bisher unbekannter Funktion identifiziert werden, dessen codierende Sequenzen auf die Synthese von O-acetylierter Cellulose hindeuten. Gezielte Experimente konnten in Folge zeigen, dass *C. difficile* in großen Mengen ein aus acetylierter Glucose bestehendes Exopolysaccharid produziert. Auf Basis von Exometabolom-Daten in MDM und CDMM [102] konnten mittels DFBA zeitaufgelöste Simulationen des Wachstums und der Produktbildung von

*C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* durchgeführt werden. Es zeigte sich, dass das Exopolysaccharid in MDM wachstumsgekoppelt sekretiert wird. Dies deutet auf die Bildung einer Schleimkapsel oder eines Biofilms hin. Vom Organismus ist bekannt, dass er Schleimkapseln [309] und Biofilme [310] bilden kann und das Exopolysaccharid könnte in beide Vorgänge involviert sein.

Das Modell ist außerdem in der Lage die komplexe Produktion von Alkansäuren quantitativ abzubilden. Die Simulationen ergaben nur Ergebnisse, die den experimentellen Werten entsprachen, wenn die  $H^+$ /ATP- und  $Na^+$ /ATP-Verhältnisse der ATP-Synthasen auf mindestens 4 gesetzt wurden. Dadurch konnte indirekt vorausgesagt werden, dass die Anzahl der c-Untereinheiten des ATP-Synthase-Komplexes mindestens 12 beträgt. Außerdem musste für die Simulation des Wachstums in CDMM nach 2,5 h die Beladung des Tetrahydrofolats für den Wood-Ljungdahl-Weg durch Formiat unterbunden werden, damit wie in *in vivo* beobachtet [102] Butanoat produziert wurde. Die Hemmung dieses Wegs könnte auch die von Karlsson *et al.* [92, 93] beobachtete Kopplung der Butanoat- und Toxin-Produktion erklären: Der Organismus benötigt Aminosäuren um Tetrahydrofolat für den Wood-Ljungdahl-Weg zu beladen und startet die Sekretion der Toxine um die Zellen des Wirts zu zerstören und deren Aminosäuren freizusetzen.

Mit dem Modell ist eine Grundlage dafür geschaffen worden Wachstum und Produktbildung von *C. difficile* zu simulieren. Für diese Arbeit waren nur Genom- und Metabolom-Daten verfügbar. Der logische nächste Schritt wäre die Einbeziehung von Transscriptom- und Proteom-Daten. Außerdem können nun, ausgehend von gut erforschten Laborstamm 630 $\Delta$ *erm*, leicht Modelle zu medizinisch relevanteren Stämmen erstellt werden. Der nächste wichtige aber auch anspruchsvolle Schritt wäre die Simulation von *in vivo*-Bedingungen um mehr über den Metabolismus während der Infektion zu erfahren.

## 5 Danksagung

Zur Entstehung dieser Arbeit haben viele Personen beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken möchte. Zunächst möchte ich mich bei meinem Mentor Herrn Prof. Dietmar Schomburg dafür bedanken, an diesem spannenden Thema arbeiten zu dürfen, sowie für die hilfreichen Diskussionen in allen Phasen dieser Arbeit. Außerdem danke ich Herrn Prof. Karsten Hiller für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie Herrn Prof. Michael Hust für die (unkomplizierte) Bereitschaft, den Vorsitz der Prüfungskommission zu übernehmen.

Ein großer Dank gebührt meinen Kooperationspartnern vom Leibniz-Institut DSMZ für die gute Zusammenarbeit am Genom von *C. difficile*; insbesondere danke ich Dr. Thomas Riedel und Dr. Boyke Bunk für die fachlichen Hilfestellungen und Diskussionen, ohne die die Reannotation von *C. difficile* nicht möglich gewesen wäre.

Besonders möchte ich mich bei Dr. Meina Neuman-Schaal für die ergiebige Kooperation, die unzähligen Ratschläge und das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken. Außerdem danke ich Dr. Alexander Riemer und Helge Stark für ihre technische Unterstützung sowie Sabine Will und Julia Hofmann für ihre experimentellen Beiträge sowie fachlichen Diskussionen. Weiterhin möchte ich meinen über die Jahre doch recht zahlreichen Bürokolleginnen sowie Mitgliedern der Mittagessen-Runde, insbesondere Jana Tillack, Christian-Alexander Dudek und Julia Helmecke, für die vielen fachlichen und privaten Gespräche danken.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung, ihr Vertrauen und ihre Geduld danken. Ohne euch hätte ich diese Arbeit nicht fertigstellen können. Ganz besonderer Dank geht an Antonia für ihre bedingungslose Unterstützung und stets aufmunternden Worte.

# Literaturverzeichnis

- [1] S. S. Magill, J. R. Edwards, W. Bamberg, Z. G. Beldavs, G. Dumyati *et al.* „Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections“. *N. Engl. J. Med.* 370.13 (2014), 1198–1208.
- [2] N.-O. Huebner, K. Dittmann, V. Henck, C. Wegner und A. Kramer. „Epidemiology of multidrug resistant bacterial organisms and *Clostridium difficile* in German hospitals in 2014: Results from a nationwide one-day point prevalence of 329 German hospitals“. *BMC Infect. Dis.* 16 (2016), 467.
- [3] M. Rupnik, M. H. Wilcox und D. N. Gerding. „*Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis“. *Nat. Rev. Microbiol.* 7.7 (2009), 526–536.
- [4] C. Lübbert, L. Zimmermann, J. Borchert, B. Hörner, R. Mutters und A. C. Rodloff. „Epidemiology and Recurrence Rates of *Clostridium difficile* Infections in Germany: A Secondary Data Analysis“. *Infect. Dis. Ther.* 5.4 (2016), 545–554.
- [5] R. F. Grube, W. Heinlein, H. Scheffer, M. Rathmayer, W. Schepp *et al.* „Ökonomische Auswirkungen einer Clostridium-difficile-Enterokolitis in deutschen Krankenhäusern auf der Basis von DRG-Kostendaten“. *Z. Gastroenterol.* 53.05 (2015), 391–397.
- [6] I. C. Hall und E. O’Toole. „Intestinal Flora in New-born Infants with a Description of New Pathogenic Anaerobe, *Bacillus difficilis*“. *Am. J. Dis. Child.* 49.2 (1935), 390–402.
- [7] A. R. Prévot. „Études de systématique bactérienne. IV. Critique de la conception actuelle du genre *Clostridium*“. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 61 (1938), 72–91.
- [8] V. B. D. Skerman, V. McGowan und P. H. A. Sneath. „Approved Lists of Bacterial Names“. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30.1 (1980), 255–420.
- [9] M. D. Collins, P. A. Lawson, A. Willems, J. J. Cordoba, J. Fernandez-Garayzabal *et al.* „The Phylogeny of the Genus *Clostridium*: Proposal of Five New Genera and Eleven New Species Combinations“. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44.4 (1994), 812–826.
- [10] W. Ludwig, K.-H. Schleifer und W. B. Whitman. „Revised road map to the phylum Firmicutes“. *Bergey’s Manual® of Systematic Bacteriology*. Hrsg. von P. D. Vos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K.-H. Schleifer und W. B. Whitman. Springer New York, 2009, 1–13.
- [11] N. Yutin und M. Y. Galperin. „A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia“. *Environ. Microbiol.* 15.10 (2013), 2631–2641.
- [12] P. A. Lawson, D. M. Citron, K. L. Tyrrell und S. M. Finegold. „Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O’Toole 1935) Prévot 1938“. *Anaerobe* 40 (2016), 95–99.
- [13] A. Oren und G. M. Garrity. „List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published“. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66.9 (2016), 3761–3764.
- [14] J. Wüst, N. M. Sullivan, U. Hardegger und T. D. Wilkins. „Investigation of an Outbreak of Antibiotic-Associated Colitis by Various Typing Methods“. *J. Clin. Microbiol.* 16.6 (1982), 1096–1101.
- [15] J. Wüst und U. Hardegger. „Transferable Resistance to Clindamycin, Erythromycin, and Tetracycline in *Clostridium difficile*“. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23.5 (1983), 784–786.
- [16] H. A. Hussain, A. P. Roberts und P. Mullany. „Generation of an erythromycin-sensitive derivative of *Clostridium difficile* strain 630 (630 $\Delta$ *erm*) and demonstration that the conjugative transposon Tn916 $\Delta$ E enters the genome of this strain at multiple sites“. *J. Med. Microbiol.* 54.2 (2005), 137–141.

- 
- [17] J. R. O'Connor, D. Lyras, K. A. Farrow, V. Adams, D. R. Powell, J. Hinds, J. K. Cheung und J. I. Rood. „Construction and analysis of chromosomal *Clostridium difficile* mutants“. *Mol. Microbiol.* 61.5 (2006), 1335–1351.
- [18] J. T. Heap, O. J. Pennington, S. T. Cartman, G. P. Carter und N. P. Minton. „The ClosTron: A universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*“. *J. Microbiol. Methods* 70.3 (2007), 452–464.
- [19] M. M. Collery, S. A. Kuehne, S. M. McBride, M. L. Kelly, M. Monot, A. Cockayne, B. Dupuy und N. P. Minton. „What’s a SNP between friends: The influence of single nucleotide polymorphisms on virulence and phenotypes of *Clostridium difficile* strain 630 and derivatives“. *Virulence* (2016), 1–15.
- [20] M. Sebahia, B. W. Wren, P. Mullany, N. F. Fairweather, N. Minton *et al.* „The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome“. *Nat. Genet.* 38.7 (2006), 779–786.
- [21] M. Monot, C. Boursaux-Eude, M. Thibonnier, D. Vallenet, I. Moszer, C. Medigue, I. Martin-Verstraete und B. Dupuy. „Reannotation of the genome sequence of *Clostridium difficile* strain 630“. *J. Med. Microbiol.* 60.8 (2011), 1193–1199.
- [22] L. J. Pettit, H. P. Browne, L. Yu, W. K. Smits, R. P. Fagan *et al.* „Functional genomics reveals that *Clostridium difficile* Spo0A coordinates sporulation, virulence and metabolism“. *BMC Genomics* 15 (2014), 160.
- [23] T. Riedel, B. Bunk, A. Thürmer, C. Spröer, E. Brzuszkiewicz *et al.* „Genome Resequencing of the Virulent and Multidrug-Resistant Reference Strain *Clostridium difficile* 630“. *Genome Announc.* 3.2 (2015), e00276–15.
- [24] H. Dannheim, T. Riedel, M. Neumann-Schaal, B. Bunk, I. Schober *et al.* „Manual curation and reannotation of the genomes of *Clostridium difficile* 630 $\Delta$ *erm* and *Clostridium difficile* 630“. *J. Med. Microbiol.* 66.3 (2017), 286–293.
- [25] E. van Eijk, S. Y. Anvar, H. P. Browne, W. Y. Leung, J. Frank, A. M. Schmitz, A. P. Roberts und W. K. Smits. „Complete genome sequence of the *Clostridium difficile* laboratory strain 630 $\Delta$ *erm* reveals differences from strain 630, including translocation of the mobile element CTn5“. *BMC Genomics* 16.1 (2015), 31.
- [26] D. Paredes-Sabja, A. Shen und J. A. Sorg. „*Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins“. *Trends Microbiol.* 22.7 (2014), 406–416.
- [27] M. H. Wilcox und W. N. Fawley. „Hospital disinfectants and spore formation by *Clostridium difficile*“. *The Lancet* 356.9238 (2000), 1324.
- [28] S. Ali, G. Moore und A. P. R. Wilson. „Spread and persistence of *Clostridium difficile* spores during and after cleaning with sporicidal disinfectants“. *J. Hosp. Infect.* 79.1 (2011), 97–98.
- [29] T. D. Lawley, S. Clare, L. J. Deakin, D. Goulding, J. L. Yen *et al.* „Use of Purified *Clostridium difficile* Spores To Facilitate Evaluation of Health Care Disinfection Regimens“. *Appl. Environ. Microbiol.* 76.20 (2010), 6895–6900.
- [30] S. D. Baines, R. O'Connor, K. Saxton, J. Freeman und M. H. Wilcox. „Activity of vancomycin against epidemic *Clostridium difficile* strains in a human gut model“. *J. Antimicrob. Chemother.* 63.3 (2009), 520–525.
- [31] R. L. P. Jump, M. J. Pultz und C. J. Donskey. „Vegetative *Clostridium difficile* Survives in Room Air on Moist Surfaces and in Gastric Contents with Reduced Acidity: a Potential Mechanism To Explain the Association between Proton Pump Inhibitors and C. difficile-Associated Diarrhea?“ *Antimicrob. Agents Chemother.* 51.8 (2007), 2883–2887.
- [32] A. Rodriguez-Palacios und J. T. LeJeune. „Moist-Heat Resistance, Spore Aging, and Superdormancy in *Clostridium difficile*“. *Appl. Environ. Microbiol.* 77.9 (2011), 3085–3091.

- [33] D. Paredes-Sabja, G. Cofre-Araneda, C. Brito-Silva, M. Pizarro-Guajardo und M. R. Sarker. „*Clostridium difficile* Spore-Macrophage Interactions: Spore Survival“. *PLOS ONE* 7.8 (2012), e43635.
- [34] K. Wörner, H. Szurmant, C. Chiang und J. A. Hoch. „Phosphorylation and functional analysis of the sporulation initiation factor Spo0A from *Clostridium botulinum*“. *Mol. Microbiol.* 59.3 (2006), 1000–1012.
- [35] I.-H. Huang und M. R. Sarker. „Complementation of a *Clostridium perfringens* spo0A Mutant with Wild-Type spo0A from Other *Clostridium* Species“. *Appl. Environ. Microbiol.* 72.9 (2006), 6388–6393.
- [36] E. Steiner, A. E. Dago, D. I. Young, J. T. Heap, N. P. Minton, J. A. Hoch und M. Young. „Multiple orphan histidine kinases interact directly with Spo0A to control the initiation of endospore formation in *Clostridium acetobutylicum*“. *Mol. Microbiol.* 80.3 (2011), 641–654.
- [37] K. O. Childress, A. N. Edwards, K. L. Nawrocki, S. E. Anderson, E. C. Woods und S. M. McBride. „The Phosphotransfer Protein CD1492 Represses Sporulation Initiation in *Clostridium difficile*“. *Infect. Immun.* 84.12 (2016), 3434–3444.
- [38] S. Underwood, S. Guan, V. Vijayasubhash, S. D. Baines, L. Graham, R. J. Lewis, M. H. Wilcox und K. Stephenson. „Characterization of the Sporulation Initiation Pathway of *Clostridium difficile* and Its Role in Toxin Production“. *J. Bacteriol.* 191.23 (2009), 7296–7305.
- [39] L. J. Deakin, S. Clare, R. P. Fagan, L. F. Dawson, D. J. Pickard *et al.* „The *Clostridium difficile* spo0A Gene Is a Persistence and Transmission Factor“. *Infect. Immun.* 80.8 (2012), 2704–2711.
- [40] K. E. Rosenbusch, D. Bakker, E. J. Kuijper und W. K. Smits. „*C. difficile* 630Δerm Spo0A Regulates Sporulation, but Does Not Contribute to Toxin Production, by Direct High-Affinity Binding to Target DNA“. *PLOS ONE* 7.10 (2012), e48608.
- [41] K. E. Mackin, G. P. Carter, P. Howarth, J. I. Rood und D. Lyras. „Spo0A Differentially Regulates Toxin Production in Evolutionarily Diverse Strains of *Clostridium difficile*“. *PLOS ONE* 8.11 (2013), e79666.
- [42] A. Howerton, M. Patra und E. Abel-Santos. „A New Strategy for the Prevention of *Clostridium difficile* Infection“. *The J. Infect. Dis.* 207.10 (2013), 1498–1504.
- [43] K. H. Wilson. „Efficiency of Various Bile Salt Preparations for Stimulation of *Clostridium difficile* Spore Germination“. *J. Clin. Microbiol.* 18.4 (1983), 1017–1019.
- [44] J. A. Sorg und A. L. Sonenshein. „Bile Salts and Glycine as Cogermnants for *Clostridium difficile* Spores“. *J. Bacteriol.* 190.7 (2008), 2505–2512.
- [45] J. A. Sorg und A. L. Sonenshein. „Chenodeoxycholate Is an Inhibitor of *Clostridium difficile* Spore Germination“. *J. Bacteriol.* 191.3 (2009), 1115–1117.
- [46] J. A. Sorg und A. L. Sonenshein. „Inhibiting the Initiation of *Clostridium difficile* Spore Germination using Analogs of Chenodeoxycholic Acid, a Bile Acid“. *J. Bacteriol.* 192.19 (2010), 4983–4990.
- [47] D. Heeg, D. A. Burns, S. T. Cartman und N. P. Minton. „Spores of *Clostridium difficile* Clinical Isolates Display a Diverse Germination Response to Bile Salts“. *PLoS ONE* 7.2 (2012), e32381.
- [48] C. M. Adams, B. E. Eckenroth, E. E. Putnam, S. Doublié und A. Shen. „Structural and Functional Analysis of the CspB Protease Required for *Clostridium* Spore Germination“. *PLoS Pathog.* 9.2 (2013), e1003165.

- [49] M. B. Francis, C. A. Allen, R. Shrestha und J. A. Sorg. „Bile Acid Recognition by the *Clostridium difficile* Germinant Receptor, CspC, Is Important for Establishing Infection“. *PLoS Pathog.* 9.5 (2013), e1003356.
- [50] M. B. Francis, C. A. Allen und J. A. Sorg. „Spore Cortex Hydrolysis Precedes Dipicolinic Acid Release during *Clostridium difficile* Spore Germination“. *J. Bacteriol.* 197.14 (2015), 2276–2283.
- [51] Y. Kevorkian, D. J. Shirley und A. Shen. „Regulation of *Clostridium difficile* spore germination by the CspA pseudoprotease domain“. *Biochimie* 122 (2016), 243–254.
- [52] A. Howerton, N. Ramirez und E. Abel-Santos. „Mapping Interactions between Germinants and *Clostridium difficile* Spores“. *J. Bacteriol.* 193.1 (2011), 274–282.
- [53] M. R. Popoff, E. J. Rubin, D. M. Gill und P. Boquet. „Actin-Specific ADP-Ribosyltransferase Produced by a *Clostridium difficile* Strain“. *Infect. Immun.* 56.9 (1988), 2299–2306.
- [54] S. Perelle, M. Gibert, P. Bourlioux, G. Corthier und M. R. Popoff. „Production of a Complete Binary Toxin (Actin-Specific ADP-Ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196“. *Infect. Immun.* 65.4 (1997), 1402–1407.
- [55] G. P. Carter, D. Lyras, D. L. Allen, K. E. Mackin, P. M. Howarth, J. R. O'Connor und J. I. Rood. „Binary Toxin Production in *Clostridium difficile* Is Regulated by CdtR, a LytTR Family Response Regulator“. *J. Bacteriol.* 189.20 (2007), 7290–7301.
- [56] P. Papatheodorou, J. E. Carette, G. W. Bell, C. Schwan, G. Guttenberg, T. R. Brummelkamp und K. Aktories. „Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) is the host receptor for the binary toxin *Clostridium difficile* transferase (CDT)“. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108.39 (2011), 16422–16427.
- [57] B. Schering, M. Bärmann, G. S. Chhatwal, U. Geipel und K. Aktories. „ADP-ribosylation of skeletal muscle and non-muscle actin by *Clostridium perfringens* iota toxin“. *Eur. J. Biochem.* 171.1-2 (1988), 225–229.
- [58] I. Gülke, G. Pfeifer, J. Liese, M. Fritz, F. Hofmann, K. Aktories und H. Barth. „Characterization of the Enzymatic Component of the ADP-Ribosyltransferase Toxin CDTa from *Clostridium difficile*“. *Infect. Immun.* 69.10 (2001), 6004–6011.
- [59] C. Schwan, B. Stecher, T. Tzivelekidis, M. van Ham, M. Rohde, W.-D. Hardt, J. Wehland und K. Aktories. „*Clostridium difficile* Toxin CDT Induces Formation of Microtubule-Based Protrusions and Increases Adherence of Bacteria“. *PLoS Pathog.* 5.10 (2009).
- [60] C. Eckert, A. Emirian, A. Le Monnier, L. Cathala, H. De Montclos *et al.* „Prevalence and pathogenicity of binary toxin-positive *Clostridium difficile* strains that do not produce toxins A and B“. *New Microbes New Infect.* 3 (2015), 12–17.
- [61] M. Monot, C. Eckert, A. Lemire, A. Hamiot, T. Dubois *et al.* „*Clostridium difficile*: New Insights into the Evolution of the Pathogenicity Locus“. *Sci. Rep.* 5 (2015), 15023.
- [62] T. Jank und K. Aktories. „Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model“. *Trends Microbiol.* 16.5 (2008), 222–229.
- [63] H. C. Krivan, G. F. Clark, D. F. Smith und T. D. Wilkins. „Cell Surface Binding Site for *Clostridium difficile* Enterotoxin: Evidence for a Glycoconjugate Containing the Sequence Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc“. *Infect. Immun.* 53.3 (1986), 573–581.
- [64] I. Florin und M. Thelestam. „Internalization of *Clostridium difficile* Cytotoxin into Cultured Human Lung Fibroblasts“. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Mol. Cell Res.* 763.4 (1983), 383–392.
- [65] I. Florin und M. Thelestam. „Lysosomal involvement in cellular intoxication with *Clostridium difficile* toxin B“. *Microb. Pathog.* 1.4 (1986), 373–385.

- [66] M. Qa'Dan, L. M. Spyres und J. D. Ballard. „pH-Induced Conformational Changes in *Clostridium difficile* Toxin B“. *Infect. Immun.* 68.5 (2000), 2470–2474.
- [67] H. Barth, G. Pfeifer, F. Hofmann, E. Maier, R. Benz und K. Aktories. „Low pH-induced Formation of Ion Channels by *Clostridium difficile* Toxin B in Target Cells“. *J. Biol. Chem.* 276.14 (2001), 10670–10676.
- [68] T. Giesemann, T. Jank, R. Gerhard, E. Maier, I. Just, R. Benz und K. Aktories. „Cholesterol-dependent Pore Formation of *Clostridium difficile* Toxin A“. *J. Biol. Chem.* 281.16 (2006), 10808–10815.
- [69] M. Egerer, T. Giesemann, T. Jank, K. J. F. Satchell und K. Aktories. „Auto-catalytic Cleavage of *Clostridium difficile* Toxins A and B Depends on Cysteine Protease Activity“. *J. Biol. Chem.* 282.35 (2007), 25314–25321.
- [70] R. N. Pruitt, B. Chagot, M. Cover, W. J. Chazin, B. Spiller und D. B. Lacy. „Structure-Function Analysis of Inositol Hexakisphosphate-induced Autoprocessing in *Clostridium difficile* Toxin A“. *The J. Biol. Chem.* 284.33 (2009), 21934–21940.
- [71] I. Just, G. Fritz, K. Aktories, M. Giry, M. R. Popoff, P. Boquet, S. Hegenbarth und C. von Eichel-Streiber. „*Clostridium difficile* Toxin B Acts on the GTP-binding Protein Rho“. *The J. Biol. Chem.* 269.14 (1994), 10706–10712.
- [72] I. Just, M. Wilm, J. Selzer, G. Rex, C. v. Eichel-Streiber, M. Mann und K. Aktories. „The Enterotoxin from *Clostridium difficile* (ToxA) Monoglucosylates the Rho Proteins“. *J. Biol. Chem.* 270.23 (1995), 13932–13936.
- [73] I. Just, J. Selzer, M. Wilm, C. v. Eichel-Streiber, M. Mann und K. Aktories. „Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B“. *Nature* 375.6531 (1995), 500–503.
- [74] C. Fiorentini, A. Fabbri, L. Falzano, A. Fattorossi, P. Matarrese, R. Rivabene und G. Donelli. „*Clostridium difficile* Toxin B Induces Apoptosis in Intestinal Cultured Cells“. *Infect. Immun.* 66.6 (1998), 2660–2665.
- [75] R. Gerhard, S. Nottrott, J. Schoentaube, H. Tatge, A. Olling und I. Just. „Glucosylation of Rho GTPases by *Clostridium difficile* toxin A triggers apoptosis in intestinal epithelial cells“. *J. Med. Microbiol.* 57.6 (2008), 765–770.
- [76] D. M. Lyerly, K. E. Saum, D. K. MacDonald und T. D. Wilkins. „Effects of *Clostridium difficile* Toxins Given Intragastrically to Animals“. *Infect. Immun.* 47.2 (1985), 349–352.
- [77] T. J. Mitchell, J. M. Ketley, S. C. Haslam, J. Stephen, D. W. Burdon, D. C. Candy und R. Daniel. „Effect of toxin A and B of *Clostridium difficile* on rabbit ileum and colon“. *Gut* 27.1 (1986), 78–85.
- [78] G. Triadafilopoulos, C. Pothoulakis, M. J. O'Brien und J. T. LaMont. „Differential effects of *Clostridium difficile* toxins A and B on rabbit ileum“. *Gastroenterology* 93.2 (1987), 273–279.
- [79] J. Torres, E. Jennische, S. Lange und I. Lönnroth. „Enterotoxins from *Clostridium difficile*; diarrhoeogenic potency and morphological effects in the rat intestine“. *Gut* 31.7 (1990), 781–785.
- [80] M. Riegler, R. Sedivy, C. Pothoulakis, G. Hamilton, J. Zacherl *et al.* „*Clostridium difficile* Toxin B Is More Potent than Toxin A in Damaging Human Colonic Epithelium In Vitro“. *J. Clin. Invest.* 95.5 (1995), 2004–2011.
- [81] T. C. Savidge, W.-h. Pan, P. Newman, M. O'Brien, P. M. Anton und C. Pothoulakis. „*Clostridium difficile* Toxin B Is an Inflammatory Enterotoxin in Human Intestine“. *Gastroenterology* 125.2 (2003), 413–420.
- [82] G. A. Hammond und J. L. Johnson. „The toxigenic element of *Clostridium difficile* strain VPI 10463“. *Microb. Pathog.* 19.4 (1995), 203–213.



- 
- [83] N. Mani und B. Dupuy. „Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor“. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98.10 (2001), 5844–5849.
- [84] R. Govind, L. Fitzwater und R. Nichols. „Observations on the role of TcdE isoforms in *Clostridium difficile* toxin secretion“. *J. Bacteriol.* (2015), JB.00224–15.
- [85] S. Matamouros, P. England und B. Dupuy. „*Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC“. *Mol. Microbiol.* 64.5 (2007), 1274–1288.
- [86] S. T. Cartman, M. L. Kelly, D. Heeg, J. T. Heap und N. P. Minton. „Precise Manipulation of the *Clostridium difficile* Chromosome Reveals a Lack of Association between the *tcdC* Genotype and Toxin Production“. *Appl. Environ. Microbiol.* 78.13 (2012), 4683–4690.
- [87] D. Bakker, W. K. Smits, E. J. Kuijper und J. Corver. „TcdC Does Not Significantly Repress Toxin Expression in *Clostridium difficile* 630 $\Delta$ Erm“. *PloS One* 7.8 (2012), e43247.
- [88] H. C. van Leeuwen, D. Bakker, P. Steindel, E. J. Kuijper und J. Corver. „*Clostridium difficile* TcdC protein binds four-stranded G-quadruplex structures“. *Nucleic Acids Res.* 41.4 (2013), 2382–2393.
- [89] S. Jabbari, S. T. Cartman und J. R. King. „Mathematical modelling reveals properties of TcdC required for it to be a negative regulator of toxin production in *Clostridium difficile*“. *J. Math. Biol.* 70 (2015), 773–804.
- [90] B. Dupuy und A. L. Sonenshein. „Regulated transcription of *Clostridium difficile* toxin genes“. *Mol. Microbiol.* 27.1 (1998), 107–120.
- [91] S. Karlsson, L. G. Burman und T. Åkerlund. „Suppression of toxin production in *Clostridium difficile* VPI 10463 by Amino Acids“. *Microbiology* 145.7 (1999), 1683–1693.
- [92] S. Karlsson, A. Lindberg, E. Norin, L. G. Burman und T. Åkerlund. „Toxins, Butyric Acid, and Other Short-Chain Fatty Acids Are Coordinately Expressed and Down-Regulated by Cysteine in *Clostridium difficile*“. *Infect. Immun.* 68.10 (2000), 5881–5888.
- [93] S. Karlsson, L. G. Burman und T. Åkerlund. „Induction of toxins in *Clostridium difficile* is associated with dramatic changes of its metabolism“. *Microbiology* 154.11 (2008), 3430–3436.
- [94] T. Karasawa, T. Maegawa, T. Nojiri, K. Yamakawa und S. Nakamura. „Effect of Arginine on Toxin Production by *Clostridium difficile* in Defined Medium“. *Microbiol. Immunol.* 41.8 (1997), 581–585.
- [95] T. Dubois, M. Dancer-Thibonnier, M. Monot, A. Hamiot, L. Bouillaut, O. Soutourina, I. Martin-Verstraete und B. Dupuy. „Control of *Clostridium difficile* Physiopathology in Response to Cysteine Availability“. *Infect. Immun.* 84.8 (2016), 2389–2405.
- [96] A. Antunes, I. Martin-Verstraete und B. Dupuy. „CcpA-mediated repression of *Clostridium difficile* toxin Gene Expr.“ *Mol. Microbiol.* 79.4 (2011), 882–899.
- [97] S. S. Dineen, A. C. Villapakkam, J. T. Nordman und A. L. Sonenshein. „Repression of *Clostridium difficile* toxin Gene Expr. by CodY“. *Mol. Microbiol.* 66.1 (2007), 206–219.
- [98] S. S. Dineen, S. M. McBride und A. L. Sonenshein. „Integration of Metabolism and Virulence by *Clostridium difficile* CodY“. *J. Bacteriol.* 192.20 (2010), 5350–5362.
- [99] I. Martin-Verstraete, J. Peltier und B. Dupuy. „The Regulatory Networks That Control *Clostridium difficile* Toxin Synthesis“. *Toxins* 8.5 (2016), 153.
- [100] S. C. Haslam, J. M. Ketley, T. J. Mitchell, J. Stephen, D. W. Burdon und D. C. A. Candy. „Growth of *Clostridium difficile* and production of toxins A and B in complex and defined media“. *J. Med. Microbiol.* 21.4 (1986), 293–297.
- [101] T. Karasawa, S. Ikoma, K. Yamakawa und S. Nakamura. „A defined growth medium for *Clostridium difficile*“. *Microbiology* 141.2 (1995), 371–375.

- [102] M. Neumann-Schaal, J. D. Hofmann, S. E. Will und D. Schomburg. „Time-resolved amino acid uptake of *Clostridium difficile* 630 $\Delta$ erm and concomitant fermentation product and toxin formation“. *BMC Microbiol.* 15 (2015), 281.
- [103] S. R. Elsdén, M. G. Hilton und J. M. Waller. „The End Products of the Metabolism of Aromatic Amino Acids by Clostridia“. *Arch. Microbiol.* 107.3 (1976), 283–288.
- [104] S. R. Elsdén und M. G. Hilton. „Volatile Acid Production from Threonine, Valine, Leucine and Isoleucine by Clostridia“. *Arch. Microbiol.* 117.2 (1978), 165–172.
- [105] W. Buckel und R. K. Thauer. „Energy conservation via electron bifurcating ferredoxin reduction and proton/Na<sup>+</sup> translocating ferredoxin oxidation“. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Bioenergetics* 1827.2 (2013), 94–113.
- [106] M. Schmehl, A. Jahn, A. M. z. Vilsendorf, S. Hennecke, B. Masepohl *et al.* „Identification of a new class of nitrogen fixation genes in *Rhodobacter capsalatus*: a putative membrane complex involved in electron transport to nitrogenase“. *Mol. Gen. Genet. MGG* 241.5-6 (1993), 602–615.
- [107] E. Biegel und V. Müller. „Bacterial Na<sup>+</sup>-translocating ferredoxin:NAD<sup>+</sup> oxidoreductase“. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107.42 (2010), 18138–18142.
- [108] V. Hess, K. Schuchmann und V. Müller. „The Ferredoxin:NAD<sup>+</sup> Oxidoreductase (Rnf) from the Acetogen *Acetobacterium woodii* Requires Na<sup>+</sup> and Is Reversibly Coupled to the Membrane Potential“. *J. Biol. Chem.* 288.44 (2013), 31496–31502.
- [109] P.-L. Tremblay, T. Zhang, S. A. Dar, C. Leang und D. R. Lovley. „The Rnf Complex of *Clostridium ljungdahlii* Is a Proton-Translocating Ferredoxin:NAD<sup>+</sup> Oxidoreductase Essential for Autotrophic Growth“. *mBio* 4.1 (2013), e00406–12.
- [110] J. Mock, Y. Zheng, A. P. Mueller, S. Ly, L. Tran *et al.* „Energy Conservation Associated with Ethanol Formation from H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> in *Clostridium autoethanogenum* Involving Electron Bifurcation“. *J. Bacteriol.* 197.18 (2015), 2965–2980.
- [111] J. Bertsch, A. Parthasarathy, W. Buckel und V. Müller. „An Electron-bifurcating Caffeyl-CoA Reductase“. *J. Biol. Chem.* 288.16 (2013), 11304–11311.
- [112] C. E. Clifton. „The Utilization of Amino Acids and of Glucose by *Clostridium botulinum*“. *J. Bacteriol.* 39.5 (1940), 485–497.
- [113] B. Nisman. „The Stickland Reaction“. *Bacteriol. Rev.* 18.1 (1954), 16–42.
- [114] L. H. Stickland. „Studies in the Metabolism of the Strict Anaerobes (Genus *Clostridium*). I. The Chemical Reactions by Which *Cl. sporogenes* Obtains Its Energy.“ *Biochem. J.* 28.5 (1934), 1746–1759.
- [115] L. H. Stickland. „Studies in the Metabolism of the Strict Anaerobes (Genus *Clostridium*). II. The Reduction of Proline by *Cl. sporogenes*.“ *Biochem. J.* 29.2 (1935), 288–290.
- [116] L. H. Stickland. „Studies in the Metabolism of the Strict Anaerobes (Genus *Clostridium*). III. The Oxidation of Alanine by *Cl. sporogenes*. IV. The Reduction of Glycine by *Cl. sporogenes*.“ *Biochem. J.* 29.4 (1935), 889–898.
- [117] B. Nisman, M. Raynaud und G. N. Cohen. „Extension of the Stickland Reaction to Several Bacterial Species“. *Arch. Biochem.* 16.3 (1948), 473–474.
- [118] D. S. Hodgins und R. H. Abeles. „Studies of the Mechanism of Action of D-Proline Reductase: The Presence on Covalently Bound Pyruvate and Its Role in the Catalytic Process“. *Arch. Biochem. Biophys.* 130 (1969), 274–285.
- [119] U. C. Kabisch, A. Gräntzdörffer, A. Schierhorn, K. P. Rücknagel, J. R. Andreesen und A. Pich. „Identification of D-Proline Reductase from *Clostridium sticklandii* as a Selenoenzyme and Indications for a Catalytically Active Pyruvoyl Group Derived from a Cysteine Residue by Cleavage of a Proprotein“. *J. Biol. Chem.* 274.13 (1999), 8445–8454.

- [120] H. Tanaka und T. C. Stadtman. „Selenium-dependent Clostridial Glycine Reductase. Purification and Characterization of the Two Membrane-associated Protein Components“. *J. Biol. Chem.* 254.2 (1979), 447–452.
- [121] R. A. Arkowitz und R. H. Abeles. „Identification of Acetyl Phosphate as the Product of Clostridial Glycine Reductase: Evidence for an Acyl Enzyme Intermediate“. *Biochemistry* 28.11 (1989), 4639–4644.
- [122] G. C. Schmidt, M. A. Logan und A. A. Tytell. „The Degradation of Arginine by *Clostridium perfringens* (BP6K)“. *J. Biol. Chem.* 198.2 (1952), 771–783.
- [123] B. M. Mitruka und R. N. Costilow. „Arginine and Ornithine Catabolism by *Clostridium botulinum*“. *J. Bacteriol.* 93.1 (1967), 295–301.
- [124] N. Fonknechten, A. Perret, N. Perchat, S. Tricot, C. Lechaplais *et al.* „A Conserved Gene Cluster Rules Anaerobic Oxidative Degradation of L-Ornithine“. *J. Bacteriol.* 191.9 (2009), 3162–3167.
- [125] S. R. O’Neil und R. D. DeMoss. „Tryptophan Transaminase from *Clostridium sporogenes*“. *Arch. Biochem. Biophys.* 127 (1968), 361–369.
- [126] H. A. Barker. „Amino Acid Degradation by Anaerobic Bacteria“. *Annu. Rev. Biochem.* 50.1 (1981), 23–40.
- [127] A. E. M. Hofmeister, R. Grabowski, D. Linder und W. Buckler. „L-Serine and L-threonine dehydratase from *Clostridium propionicum*. Two enzymes with different prosthetic groups“. *Eur. J. Biochem.* 215.2 (1993), 341–349.
- [128] E. A. Morozova, V. V. Kulikova, D. V. Yashin, N. V. Anufrieva, N. Y. Anisimova *et al.* „Kinetic Parameters and Cytotoxic Activity of Recombinant Methionine  $\gamma$ -Lyase from *Clostridium tetani*, *Clostridium sporogenes*, *Porphyromonas gingivalis* and *Citrobacter freundii*“. *Acta Naturae* 5.3 (2013), 92–98.
- [129] S. Auger, M. P. Gomez, A. Danchin und I. Martin-Verstraete. „The PatB protein of *Bacillus subtilis* is a C-S-lyase“. *Biochimie* 87.2 (2005), 231–238.
- [130] X. Mai und M. W. Adams. „Indolepyruvate Ferredoxin Oxidoreductase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*. A New Enzyme Involved in Peptide Fermentation“. *The J. Biol. Chem.* 269.24 (1994), 16726–16732.
- [131] J. Heider, X. Mai und M. W. Adams. „Characterization of 2-Ketoisovalerate Ferredoxin Oxidoreductase, a New and Reversible Coenzyme A-Dependent Enzyme Involved in Peptide Fermentation by Hyperthermophilic Archaea.“ *J. Bacteriol.* 178.3 (1996), 780–787.
- [132] A. Tersteegen, D. Linder, R. K. Thauer und R. Hedderich. „Structures and functions of four anabolic 2-oxoacid oxidoreductases in *Methanobacterium thermoautotrophicum*“. *Eur. J. Biochem. / FEBS* 244.3 (1997), 862–868.
- [133] P. P. Lin, L. Mi, A. H. Morioka, K. M. Yoshino, S. Konishi *et al.* „Consolidated bioprocessing of cellulose to isobutanol using *Clostridium thermocellum*“. *Metab. Eng.* 31 (2015), 44–52.
- [134] R. C. Valentine und R. S. Wolfe. „Purification and Role of Phosphotransbutyrylase“. *J. Biol. Chem.* 235.7 (1960), 1948–1952.
- [135] J. W. Cary, D. J. Petersen, E. T. Papoutsakis und G. N. Bennett. „Cloning and Expression of *Clostridium acetobutylicum* Phosphotransbutyrylase and Butyrate Kinase Genes in *Escherichia coli*“. *J. Bacteriol.* 170.10 (1988), 4613–4618.
- [136] D. P. Wiesenborn, F. B. Rudolph und E. T. Papoutsakis. „Phosphotransbutyrylase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Its Role in Acidogenesis.“ *Appl. Environ. Microbiol.* 55.2 (1989), 317–322.
- [137] M. Musfeldt und P. Schönheit. „Novel Type of ADP-Forming Acetyl Coenzyme A Synthetase in Hyperthermophilic Archaea: Heterologous Expression and Characterization of Isoenzymes

- from the Sulfate Reducer *Archaeoglobus fulgidus* and the Methanogen *Methanococcus jannaschii*“. *J. Bacteriol.* 184.3 (2002), 636–644.
- [138] M. Hetzel, M. Brock, T. Selmer, A. J. Pierik, B. T. Golding und W. Buckel. „Acryloyl-CoA reductase from *Clostridium propionicum*. An enzyme complex of propionyl-CoA dehydrogenase and electron-transferring flavoprotein“. *Eur. J. Biochem.* 270.5 (2003), 902–910.
- [139] B. M. Martins, S. Macedo-Ribeiro, J. Bresser, W. Buckel und A. Messerschmidt. „Structural basis for stereo-specific catalysis in NAD<sup>+</sup>-dependent (*R*)-2-hydroxyglutarate dehydrogenase from *Acidaminococcus fermentans*“. *FEBS J.* 272.1 (2005), 269–281.
- [140] J. Kim, D. Darley, T. Selmer und W. Buckel. „Characterization of (*R*)-2-Hydroxyisocaproate Dehydrogenase and a Family III Coenzyme A Transferase Involved in Reduction of L-Leucine to Isocaproate by *Clostridium difficile*“. *Appl. Environ. Microbiol.* 72.9 (2006), 6062–6069.
- [141] S. Dickert, A. J. Pierik, D. Linder und W. Buckel. „The involvement of coenzyme A esters in the dehydration of (*R*)-phenyllactate to (*E*)-cinnamate by *Clostridium sporogenes*“. *Eur. J. Biochem.* 267.12 (2000), 3874–3884.
- [142] J. Kim, D. Darley und W. Buckel. „2-Hydroxyisocaproyl-CoA dehydratase and its activator from *Clostridium difficile*“. *FEBS J.* 272.2 (2005), 550–561.
- [143] A. Parthasarathy, A. J. Pierik, J. Kahnt, O. Zelder und W. Buckel. „Substrate Specificity of 2-Hydroxyglutaryl-CoA Dehydratase from *Clostridium symbiosum*: Toward a Bio-Based Production of Adipic Acid“. *Biochemistry* 50.17 (2011), 3540–3550.
- [144] G. Schweiger und W. Buckel. „On the dehydration of (*R*)-lactate in the fermentation of alanine to propionate by *Clostridium propionicum*“. *FEBS Lett.* 171.1 (1984), 79–84.
- [145] G. Schweiger und W. Buckel. „Identification of acrylate, the product of the dehydration of (*R*)-lactate catalysed by cell-free extracts from *Clostridium propionicum*“. *FEBS Lett.* 185.2 (1985), 253–256.
- [146] R. D. Kuchta und R. H. Abeles. „Lactate Reduction in *Clostridium propionicum*. Purification and Properties of Lactyl-CoA Dehydratase“. *J. Biol. Chem.* 260.24 (1985), 13181–13189.
- [147] R. D. Kuchta, G. R. Hanson, B. Holmquist und R. H. Abeles. „Fe-S Centers in Lactyl-CoA Dehydratase“. *Biochemistry* 25.23 (1986), 7301–7307.
- [148] A. E. M. Hofmeister und W. Buckel. „(*R*)-Lactyl-CoA dehydratase from *Clostridium propionicum*. Stereochemistry of the dehydration of (*R*)-2-hydroxybutyryl-CoA to crotonyl-CoA“. *Eur. J. Biochem.* 206.2 (1992), 547–552.
- [149] T. Selmer, A. Willanzheimer und M. Hetzel. „Propionate CoA-transferase from *Clostridium propionicum*. Cloning of the gene and identification of glutamate 324 at the active site“. *Eur. J. Biochem.* 269.1 (2002), 372–380.
- [150] M. L. Britz und R. G. Wilkinson. „Leucine dissimilation to isovaleric and isocaproic acids by cell suspensions of amino acid fermenting anaerobes: the Stickland reaction revisited“. *Can. J. Microbiol.* 28.3 (1982), 291–300.
- [151] S. W. Ragsdale. „The Eastern and Western branches of the Wood/Ljungdahl pathway: how the East and West were won“. *BioFactors* 6.1 (1997), 3–11.
- [152] K. Lentz und H. G. Wood. „Synthesis of Acetate from Formate and Carbon Dioxide by *Clostridium thermoaceticum*“. *J. Biol. Chem.* 215.2 (1955), 645–654.
- [153] L.-F. Li, L. Ljungdahl und H. G. Wood. „Properties of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Dependent Formate Dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*“. *J. Bacteriol.* 92.2 (1966), 405–412.
- [154] J. C. Rabinowitz und W. E. Pricer. „ATP Formation Accompanying Formiminoglycine Utilization“. *J. Am. Chem. Soc.* 78.7 (1956), 1513–1514.

- [155] J. C. Rabinowitz und W. E. Pricer. „The Eenzymatic Synthesis of N<sup>10</sup>-Formyltetrahydrofolic Acid and Its Role in ATP Formation During Formiminoglycine Degradation“. *J. Am. Chem. Soc.* 78.16 (1956), 4176–4178.
- [156] A. Y. Sun, L. Ljungdahl und H. G. Wood. „Total Synthesis of Acetate from CO<sub>2</sub> II. Purification and Properties of Formyltetrahydrofolate Synthetase from *Clostridium thermoaceticum*“. *J. Bacteriol.* 98.2 (1969), 842–844.
- [157] J. M. Brewer, L. Ljungdahl, T. E. Spencer und S. H. Neece. „Physical Properties of Formyltetrahydrofolate Synthetase from *Clostridium thermoaceticum*“. *J. Biol. Chem.* 245.18 (1970), 4798–4803.
- [158] W. E. O’Brien, J. M. Brewer und L. G. Ljungdahl. „Purification and Characterization of Thermostable 5,10-Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*“. *J. Biol. Chem.* 248.2 (1973), 403–408.
- [159] L. G. Ljungdahl, W. E. O’Brien, M. R. Moore und M. T. Liu. „Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase from *Clostridium formicoaceticum* and Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase, Methenyltetrahydrofolate Cyclohydrolase (combined) from *Clostridium thermoaceticum*“. *Methods Enzymol.* 66 (1980), 599–609.
- [160] J. E. Clark und L. G. Ljungdahl. „Purification and Properties of 5,10-Methenyltetrahydrofolate Cyclohydrolase from *Clostridium formicoaceticum*“. *J. Biol. Chem.* 257.7 (1982), 3833–3836.
- [161] J. Bertsch, C. Öppinger, V. Hess, J. D. Langer und V. Müller. „Heterotrimeric NADH-Oxidizing Methylenetetrahydrofolate Reductase from the Acetogenic Bacterium *Acetobacterium woodii*“. *J. Bacteriol.* 197.9 (2015), 1681–1689.
- [162] J. Mock, S. Wang, H. Huang, J. Kahnt und R. K. Thauer. „Evidence for a Hexaheteromeric Methylenetetrahydrofolate Reductase in *Moorella thermoacetica*“. *J. Bacteriol.* 196.18 (2014), 3303–3314.
- [163] M. Köpke, C. Held, S. Hujer, H. Liesegang, A. Wiezer *et al.* „*Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas“. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107.29 (2010), 13087–13092.
- [164] H. Nagarajan, M. Sahin, J. Nogales, H. Latif, D. R. Lovley, A. Ebrahim und K. Zengler. „Characterizing acetogenic metabolism using a genome-scale metabolic reconstruction of *Clostridium ljungdahlii*“. *Microb. Cell Fact.* 12 (2013), 118.
- [165] S. I. Hu, E. Pezacka und H. G. Wood. „Acetate synthesis from carbon monoxide by *Clostridium thermoaceticum*. Purification of the Corrinoid Protein“. *J. Biol. Chem.* 259.14 (1984), 8892–8897.
- [166] H. L. Drake, S. I. Hu und H. G. Wood. „Purification of five components from *Clostridium thermoaceticum* which catalyze synthesis of acetate from pyruvate and methyltetrahydrofolate. Properties of Phosphotransacetylase.“ *J. Biol. Chem.* 256.21 (1981), 11137–11144.
- [167] H. L. Drake, S. I. Hu und H. G. Wood. „Purification of Carbon Monoxide Dehydrogenase, a Nickel Enzyme from *Clostridium thermoaceticum*“. *J. Biol. Chem.* 255.15 (1980), 7174–7180.
- [168] S. I. Hu, H. L. Drake und H. G. Wood. „Synthesis of Acetyl Coenzyme A from Carbon Monoxide, Methyltetrahydrofolate, and Coenzyme A by Enzymes from *Clostridium thermoaceticum*“. *J. Bacteriol.* 149.2 (1982), 440–448.
- [169] S. W. Ragsdale und H. G. Wood. „Acetate Biosynthesis by Acetogenic Bacteria. Evidence that Carbon Monoxide Dehydrogenase is the Condensing Enzyme that Catalyzes the Final Steps of the Synthesis.“ *J. Biol. Chem.* 260.7 (1985), 3970–3977.
- [170] H. Berndt und H. G. Schlegel. „Kinetics and Properties of  $\beta$ -Ketothiolase from *Clostridium pasteurianum*“. *Arch. Microbiol.* 103.1 (1975), 21–30.

- [171] M. G. Hartmanis und T. C. Stadtman. „Isolation of a selenium-containing thiolase from *Clostridium kluyveri*: Identification of the selenium moiety as selenomethionine.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79.16 (1982), 4912–4916.
- [172] M. X. Sliwowski und M. G. N. Hartmanis. „Simultaneous Single-Step Purification of Thiolase and NADP-Dependent 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase from *Clostridium kluyveri*“. *Anal. Biochem.* 141.2 (1984), 344–347.
- [173] M. X. Sliwowski und T. C. Stadtman. „Incorporation and Distribution of Selenium into Thiolase from *Clostridium kluyveri*“. *J. Biol. Chem.* 260.5 (1985), 3140–3144.
- [174] D. P. Wiesenborn, F. B. Rudolph und E. T. Papoutsakis. „Thiolase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Its Role in the Synthesis of Acids and Solvents“. *Appl. Environ. Microbiol.* 54.11 (1988), 2717–2722.
- [175] H. v. Hugo, S. Schoberth, V. K. Madan und G. Gottschalk. „Coenzyme Specificity of Dehydrogenases and Fermentation of Pyruvate by Clostridia“. *Arch. Mikrobiol.* 87.3 (1972), 189–202.
- [176] V. K. Madan, P. Hillmer und G. Gottschalk. „Purification and Properties of NADP-Dependent L(+)-3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase from *Clostridium kluyveri*“. *Eur. J. Biochem.* 32.1 (1973), 51–56.
- [177] G. D. Colby und J. S. Chen. „Purification and Properties of 3-Hydroxybutyryl-Coenzyme A Dehydrogenase from *Clostridium beijerinckii* (" *Clostridium butylicum* ") NRRL B593“. *Appl. Environ. Microbiol.* 58.10 (1992), 3297–3302.
- [178] Z. L. Boynton, G. N. Bennet und F. B. Rudolph. „Cloning, Sequencing, and Expression of Clustered Genes Encoding  $\beta$ -Hydroxybutyryl-Coenzyme A (CoA) Dehydrogenase, Crotonase, and Butyryl-CoA Dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824“. *J. Bacteriol.* 178.11 (1996), 3015–3024.
- [179] E.-H. Aboulnaga, O. Pinkenburg, J. Schiffels, A. El-Refai, W. Buckel und T. Selmer. „Butyrate production in *Escherichia coli*: Exploitation of an oxygen tolerant bifurcating butyryl-CoA dehydrogenase/electron transferring flavoprotein complex from *Clostridium difficile*“. *J. Bacteriol.* (2013), JB.00321–13.
- [180] R. M. Waterson, F. J. Castellino, G. M. Hass und R. L. Hill. „Purification and Characterization of Crotonase from *Clostridium acetobutylicum*“. *J. Biol. Chem.* 247.16 (1972), 5266–5271.
- [181] U. Scherf und W. Buckel. „Purification and properties of an iron-sulfur and FAD-containing 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase/vinylacetyl-CoA $\Delta$ 3- $\Delta$ 2-isomerase from *Clostridium aminobutyricum*“. *Eur. J. Biochem.* 215.2 (1993), 421–429.
- [182] F. Li, J. Hinderberger, H. Seedorf, J. Zhang, W. Buckel und R. K. Thauer. „Coupled Ferredoxin and Crotonyl Coenzyme A (CoA) Reduction with NADH Catalyzed by the Butyryl-CoA Dehydrogenase/Etf Complex from *Clostridium kluyveri*“. *J. Bacteriol.* 190.3 (2008), 843–850.
- [183] S. Goodwin, J. D. McPherson und W. R. McCombie. „Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies“. *Nat. Rev. Genet.* 17.6 (2016), 333–351.
- [184] T. Riedel, B. Bunk, J. Wittmann, A. Thürmer, C. Spröer *et al.* „Complete Genome Sequence of the *Clostridium difficile* Type Strain DSM 1296<sup>T</sup>“. *Genome Announc.* 3.5 (2015), e01186–15.
- [185] H. Dannheim, S. E. Will, D. Schomburg und M. Neumann-Schaal. „*Clostridioides difficile* 630 $\Delta$ *erm* in silico and in vivo - quantitative growth and extensive polysaccharide secretion“. *FEBS Open Bio* 7.4 (2017), 602–615.

- 
- [186] P. Stothard und D. S. Wishart. „Automated bacterial genome analysis and annotation“. *Curr. Opin. Microbiol.* 9.5 (2006), 505–510.
- [187] E. J. Richardson und M. Watson. „The automatic annotation of bacterial genomes“. *Briefings Bioinf.* 14.1 (2013), 1–12.
- [188] R. K. Aziz, D. Bartels, A. A. Best, M. DeJongh, T. Disz *et al.* „The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology“. *BMC Genomics* 9 (2008), 75.
- [189] T. Tatusova, M. DiCuccio, A. Badretdin, V. Chetvernin, E. P. Nawrocki *et al.* „NCBI prokaryotic genome annotation pipeline“. *Nucleic Acids Res.* 44.14 (2016), 6614–6624.
- [190] T. Seemann. „Prokka: rapid prokaryotic genome annotation“. *Bioinformatics* 30.14 (2014), 2068–2069.
- [191] D. Hyatt, G.-L. Chen, P. F. LoCascio, M. L. Land, F. W. Larimer und L. J. Hauser. „Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification“. *BMC Bioinf.* 11 (2010), 119.
- [192] K. Lagesen, P. Hallin, E. A. Rødland, H.-H. Stærfeldt, T. Rognes und D. W. Ussery. „RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes“. *Nucleic Acids Res.* 35.9 (2007), 3100–3108.
- [193] D. Laslett und B. Canback. „ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences“. *Nucleic Acids Res.* 32.1 (2004), 11–16.
- [194] T. N. Petersen, S. Brunak, G. von Heijne und H. Nielsen. „SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions“. *Nat. Methods* 8.10 (2011), 785–786.
- [195] D. L. Kolbe und S. R. Eddy. „Fast filtering for RNA homology search“. *Bioinformatics* 27.22 (2011), 3102–3109.
- [196] C. Camacho, G. Coulouris, V. Avagyan, N. Ma, J. Papadopoulos, K. Bealer und T. L. Madden. „BLAST+: architecture and applications“. *BMC Bioinf.* 10 (2009), 421.
- [197] UniProt Consortium. „UniProt: a hub for protein information“. *Nucleic Acids Res.* 43.D (2015), D204–D212.
- [198] N. A. O’Leary, M. W. Wright, J. R. Brister, S. Ciufu, D. Haddad *et al.* „Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation“. *Nucleic Acids Res.* 44.D (2016), D733–D745.
- [199] S. R. Eddy. „Accelerated Profile HMM Searches“. *PLoS Comput. Biol.* 7.10 (2011), e1002195.
- [200] R. D. Finn, P. Coghill, R. Y. Eberhardt, S. R. Eddy, J. Mistry *et al.* „The Pfam protein families database: towards a more sustainable future“. *Nucleic Acids Res.* 44.D (2016), D279–D285.
- [201] I. Pedruzzi, C. Rivoire, A. H. Auchincloss, E. Coudert, G. Keller *et al.* „HAMAP in 2015: updates to the protein family classification and annotation system“. *Nucleic Acids Res.* 43.D (2015), D1064–D1070.
- [202] C. Bannert, A. Welfle, C. Aus dem Spring und D. Schomburg. „BrEPS: a flexible and automatic protocol to compute enzyme-specific sequence profiles for functional annotation“. *BMC Bioinf.* 11.1 (2010), 589.
- [203] S. Quester und D. Schomburg. „EnzymeDetector: an integrated enzyme function prediction tool and database“. *BMC Bioinf.* 12.1 (2011), 376.
- [204] A. Chang, I. Schomburg, S. Placzek, L. Jeske, M. Ulbrich, M. Xiao, C. W. Sensen und D. Schomburg. „BRENDA in 2015: exciting developments in its 25th year of existence“. *Nucleic Acids Res.* 43.D (2015), D439–D446.
- [205] D. A. Benson, M. Cavanaugh, K. Clark, I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell und E. W. Sayers. „GenBank“. *Nucleic Acids Res.* 41.D (2013), D36–D42.

- [206] M. Kanehisa, Y. Sato, M. Kawashima, M. Furumichi und M. Tanabe. „KEGG as a reference resource for gene and protein annotation“. *Nucleic Acids Res.* (2015), gkv1070.
- [207] A. R. Wattam, J. J. Davis, R. Assaf, S. Boisvert, T. Brettin *et al.* „Improvements to PATRIC, the all-bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center“. *Nucleic Acids Res.* 45.D (2017), D535–D542.
- [208] J. Stelling. „Mathematical models in microbial Syst. Biol.“ *Curr. Opin. Microbiol.* 7.5 (2004), 513–518.
- [209] K. Raman und N. Chandra. „Flux balance analysis of biological systems: applications and challenges“. *Briefings Bioinf.* 10.4 (2009), 435–449.
- [210] M. Durot, P.-Y. Bourguignon und V. Schachter. „Genome-scale models of bacterial metabolism: reconstruction and applications“. *FEMS Microbiol. Rev.* 33.1 (2009), 164–190.
- [211] A. C. Burton. „The properties of the steady state compared to those of equilibrium as shown in characteristic biological behavior“. *J. Cell. Comp. Physiol.* 14.3 (1939), 327–349.
- [212] S. Klamt, S. Schuster und E. D. Gilles. „Calculability Analysis in Underdetermined Metabolic Networks Illustrated by a Model of the Central Metabolism in Purple Nonsulfur Bacteria“. *Biotechnol. Bioeng.* 77.7 (2002), 734–751.
- [213] J. D. Orth, I. Thiele und B. Ø. Palsson. „What is flux balance analysis?“ *Nat. Biotechnol.* 28.3 (2010), 245–248.
- [214] R. U. Ibarra, J. S. Edwards und B. O. Palsson. „*Escherichia coli* K-12 undergoes adaptive evolution to achieve in silico predicted optimal growth“. *Nature* 420.6912 (2002), 186–189.
- [215] D.-Y. Lee, L. T. Fan, S. Park, S. Y. Lee, S. Shafie, B. Bertók und F. Friedler. „Complementary identification of multiple flux distributions and multiple metabolic pathways“. *Metab. Eng.* 7.3 (2005), 182–200.
- [216] R. Mahadevan und C. H. Schilling. „The effects of alternate optimal solutions in constraint-based genome-scale metabolic models“. *Metab. Eng.* 5.4 (2003), 264–276.
- [217] M. R. Antoniewicz. „Dynamic metabolic flux analysis — tools for probing transient states of metabolic networks“. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24.6 (2013), 973–978.
- [218] A. Varma und B. O. Palsson. „Stoichiometric Flux Balance Models Quantitatively Predict Growth and Metabolic By-Product Secretion in Wild-Type *Escherichia coli* W3110.“ *Appl. Environ. Microbiol.* 60.10 (1994), 3724–3731.
- [219] R. Mahadevan, J. S. Edwards und F. J. Doyle III. „Dynamic Flux Balance Analysis of Diauxic Growth in *Escherichia coli*“. *Biophys. J.* 83.3 (2002), 1331–1340.
- [220] C. Herwig, I. Marison und U. von Stockar. „On-line Stoichiometry and Identification of Metabolic State Under Dynamic Process Conditions“. *Biotechnol. Bioeng.* 75.3 (2001), 345–354.
- [221] F. Llaneras und J. Picó. „A procedure for the estimation over time of metabolic fluxes in scenarios where measurements are uncertain and/or insufficient“. *BMC Bioinf.* 8 (2007), 421.
- [222] J. Niklas, E. Schröder, V. Sandig, T. Noll und E. Heinzle. „Quantitative characterization of metabolism and metabolic shifts during growth of the new Hum. Cell line AGE1.HN using time resolved metabolic flux analysis“. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 34.5 (2011), 533–545.
- [223] G. Lequeux, J. Beauprez, J. Maertens, E. Van Horen, W. Soetaert, E. Vandamme und P. A. Vanrolleghem. „Dynamic Metabolic Flux Analysis Demonstrated on Cultures Where the Limiting Substrate Is Changed from Carbon to Nitrogen and *Vice Versa*“. *Biomed Res. Int.* 2010 (2010), e621645.
- [224] P. Jones, D. Binns, H.-Y. Chang, M. Fraser, W. Li *et al.* „InterProScan 5: genome-scale protein function classification“. *Bioinformatics* 30.9 (2014), 1236–1240.



- [225] J. Oberto. „SyntTax: a web server linking synteny to prokaryotic taxonomy“. *BMC Bioinf.* 14 (2013), 4.
- [226] R. Rex. „Towards a new view on metabolic networks: Automated reconstruction and large-scale computational analysis applied to *Dinoroseobacter shibae*“. Diss. Braunschweig: Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, 2013.
- [227] M. Lang, M. Stelzer und D. Schomburg. „*BKM-react*, an integrated biochemical reaction database“. *BMC Biochem.* 12.1 (2011), 42.
- [228] S. A. Riemer. „*metano* – An open-source toolbox for the reconstruction and analysis of genome-scale metabolic models“. Diss. Braunschweig: Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, 2013.
- [229] S. Placzek, I. Schomburg, A. Chang, L. Jeske, M. Ulbrich, J. Tillack und D. Schomburg. „BRENDA in 2017: new perspectives and new tools in BRENDA“. *Nucleic Acids Res.* 45 (2016), D380–D388.
- [230] R. Caspi, T. Altman, R. Billington, K. Dreher, H. Foerster *et al.* „The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases“. *Nucleic Acids Res.* 42.D (2014), D459–D471.
- [231] C. Chaouiya, D. Bérenguier, S. M. Keating, A. Naldi, M. P. van Iersel *et al.* „SBML qualitative models: a model representation format and infrastructure to foster interactions between qualitative modelling formalisms and tools“. *BMC Syst. Biol.* 7 (2013), 135.
- [232] F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham und M. Schaechter. *Physiology of the Bacterial Cell. A Molecular Approach*. Sunderland: Sinauer Associates, 1990.
- [233] M. A. Machnicka, K. Milanowska, O. O. Oglou, E. Purta, M. Kurkowska *et al.* „MODO-MICS: a database of RNA modification pathways—2013 update“. *Nucleic Acids Res.* 41.D (2012), D262–D267.
- [234] M. Dauner und U. Sauer. „Stoichiometric Growth Model for Riboflavin-Producing *Bacillus subtilis*“. *Biotechnol. Bioeng.* 76.2 (2001), 132–143.
- [235] M. Heinemann, A. Kümmel, R. Ruinatscha und S. Panke. „In silico Genome-Scale Reconstruction and Validation of the *Staphylococcus aureus* Metabolic Network“. *Biotechnol. Bioeng.* 92.7 (2005), 850–864.
- [236] I. R. Poxton und T. D. I. Cartmill. „Immunochemistry of the Cell-Surface Carbohydrate Antigens of *Clostridium difficile*“. *J. Gen. Microbiol.* 128.6 (1982), 1365–1370.
- [237] J. Peltier, P. Courtin, I. E. Meouche, L. Lemée, M.-P. Chapot-Chartier und J.-L. Pons. „*Clostridium difficile* Has an Original Peptidoglycan Structure with a High Level of N-Acetylglucosamine Deacetylation and Mainly 3-3 Cross-links“. *J. Biol. Chem.* 286.33 (2011), 29053–29062.
- [238] J. Ganeshapillai, E. Vinogradov, J. Rousseau, J. S. Weese und M. A. Monteiro. „*Clostridium difficile* cell-surface polysaccharides composed of pentaglycosyl and hexaglycosyl phosphate repeating units“. *Carbohydr. Res.* 343.4 (2008), 703–710.
- [239] C. W. Reid, E. Vinogradov, J. Li, H. C. Jarrell, S. M. Logan und J.-R. Brisson. „Structural characterization of surface glycans from *Clostridium difficile*“. *Carbohydr. Res.* 354 (2012), 65–73.
- [240] D. B. Drucker, H. M. Wardle und V. Boote. „Phospholipid Profiles of *Clostridium difficile*“. *J. Bacteriol.* 178.19 (1996), 5844–5846.
- [241] S. R. Elsdén, M. G. Hilton, K. R. Parsley und R. Self. „The Lipid Fatty Acids of Proteolytic Clostridia“. *J. Gen. Microbiol.* 118.1 (1980), 115–123.

- [242] D. Amador-Noguez, I. A. Brasg, X.-J. Feng, N. Roquet und J. D. Rabinowitz. „Metabolome Remodeling during the Acidogenic-Solventogenic Transition in *Clostridium acetobutylicum*“. *Appl. Environ. Microbiol.* 77.22 (2011), 7984–7997.
- [243] I. Thiele und B. Ø. Palsson. „A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction“. *Nat. Protoc.* 5.1 (2010), 93–121.
- [244] J. B. Russell und R. L. Baldwin. „Comparison of Maintenance Energy Expenditures and Growth Yields Among Several Rumen Bacteria Grown on Continuous Culture“. *Appl. Environ. Microbiol.* 37.3 (1979), 537–543.
- [245] F. Li, C. H. Hagemeyer, H. Seedorf, G. Gottschalk und R. K. Thauer. „Re-Citrate Synthase from *Clostridium kluyveri* Is Phylogenetically Related to Homocitrate Synthase and Isopropylmalate Synthase Rather Than to Si-Citrate Synthase“. *J. Bacteriol.* 189.11 (2007), 4299–4304.
- [246] N.-C. Wang und C.-Y. Lee. „Molecular cloning of the aspartate 4-decarboxylase gene from *Pseudomonas* sp. ATCC 19121 and characterization of the bifunctional recombinant enzyme“. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73.2 (2006), 339–348.
- [247] M. Povelainen und A. N. Miasnikov. „Production of xylitol by metabolically engineered strains of *Bacillus subtilis*“. *J. Biotechnol.* 128.1 (2007), 24–31.
- [248] A. Faulds-Pain, S. M. Twine, E. Vinogradov, P. C. R. Strong, A. Dell *et al.* „The post-translational modification of the *Clostridium difficile* flagellin affects motility, cell surface properties and virulence“. *Mol. Microbiol.* 94.2 (2014), 272–289.
- [249] J. Au, J. Choi, S. W. Jones, K. P. Venkataramanan und M. R. Antoniewicz. „Parallel labeling experiments validate *Clostridium acetobutylicum* metabolic network model for <sup>13</sup>C metabolic flux analysis“. *Metab. Eng.* 26 (2014), 23–33.
- [250] D. Amador-Noguez, X.-J. Feng, J. Fan, N. Roquet, H. Rabitz und J. D. Rabinowitz. „Systems-Level Metabolic Flux Profiling Elucidates a Complete, Bifurcated Tricarboxylic Acid Cycle in *Clostridium acetobutylicum*“. *J. Bacteriol.* 192.17 (2010), 4452–4461.
- [251] S. B. Crown, D. C. Indurthi, W. S. Ahn, J. Choi, E. T. Papoutsakis und M. R. Antoniewicz. „Resolving the TCA cycle and pentose-phosphate pathway of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824: Isotopomer analysis, In Vitro activities and expression analysis“. *Biotechnol. J.* 6.3 (2011), 300–305.
- [252] S. M. Firestone, S.-W. Poon, E. J. Mueller, J. Stubbe und V. J. Davisson. „Reactions Catalyzed by 5-Aminoimidazole Ribonucleotide Carboxylases from *Escherichia coli* and *Gallus gallus*: A Case for Divergent Catalytic Mechanisms?“ *Biochemistry* 33.39 (1994), 11927–11934.
- [253] S. Tranchimand, C. M. Starks, I. I. Mathews, S. C. Hockings und T. J. Kappock. „*Treponema denticola* PurE Is a Bacterial AIR Carboxylase“. *Biochemistry* 50.21 (2011), 4623–4637.
- [254] A. M. Brown, S. L. Hoopes, R. H. White und C. A. Sarisky. „Purine biosynthesis in archaea: variations on a theme“. *Biology Direct* 6.1 (2011), 63.
- [255] E. Meyer, N. J. Leonard, B. Bhat, J. Stubbe und J. M. Smith. „Purification and Characterization of the *purE*, *purK*, and *purC* Gene Products: Identification of a Previously Unrecognized Energy Requirement in the Purine Biosynthetic Pathway“. *Biochemistry* 31.21 (1992), 5022–5032.
- [256] W. M. Patrick, E. M. Quandt, D. B. Swartzlander und I. Matsumura. „Multicopy Suppression Underpins Metabolic Evolvability“. *Mol. Biol. Evol.* 24.12 (2007), 2716–2722.
- [257] M. C. Weghoff, J. Bertsch und V. Müller. „A novel mode of lactate metabolism in strictly anaerobic bacteria“. *Environ. Microbiol.* 17.3 (2015), 670–677.

- [258] B. Desguin, P. Goffin, E. Viaene, M. Kleerebezem, V. Martin-Diaconescu *et al.* „Lactate racemase is a nickel-dependent enzyme activated by a widespread maturation system“. *Nat. Commun.* 5.3615 (2014), 1–12.
- [259] F. Sievers, A. Wilm, D. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus *et al.* „Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega“. *Mol. Syst. Biol.* 7 (2011), 539.
- [260] C. Raynaud, P. Sarçabal, I. Meynial-Salles, C. Croux und P. Soucaille. „Molecular characterization of the 1,3-propanediol (1,3-PD) operon of *Clostridium butyricum*“. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100.9 (2003), 5010–5015.
- [261] J. R. O’Brien, C. Raynaud, C. Croux, L. Girbal, P. Soucaille und W. N. Lanzilotta. „Insight into the Mechanism of the B<sub>12</sub>-Independent Glycerol Dehydratase from *Clostridium butyricum*: Preliminary Biochemical and Structural Characterization“. *Biochemistry* 43.16 (2004), 4635–4645.
- [262] M. Biasini, S. Bienert, A. Waterhouse, K. Arnold, G. Studer *et al.* „SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information“. *Nucleic Acids Res.* 42.W (2014), W252–W258.
- [263] A. Grosdidier, V. Zoete und O. Michielin. „SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS“. *Nucleic Acids Res.* 39.W (2011), W270–W277.
- [264] Y. Katano, S. Fujinami, A. Kawakoshi, H. Nakazawa, S. Oji *et al.* „Complete genome sequence of *Oscillibacter valericigenes* Sjm18-20(T) (=NBRC 101213(T))“. *Stand. Genomic Sci.* 6.3 (2012), 406–414.
- [265] H. J. Vogel und B. D. Davis. „Glutamic  $\gamma$ -Semialdehyde and  $\Delta^1$ -Pyrroline-5-carboxylic Acid, Intermediates in the Biosynthesis of Proline“. *J. Am. Chem. Soc.* 74.1 (1952), 109–112.
- [266] I. Williams und L. Frank. „Improved Chemical Synthesis and Enzymatic Assay of  $\Delta^1$ -Pyrroline-5-Carboxylic Acid“. *Anal. Biochem.* 64.1 (1975), 85–97.
- [267] S. Jackson, M. Calos, A. Myers und W. T. Self. „Analysis of Proline Reduction in the Nosocomial Pathogen *Clostridium difficile*“. *J. Bacteriol.* 188.24 (2006), 8487–8495.
- [268] Y. Ozawa, M. A. Siddiqui, Y. Takahashi, A. Urushiyama, D. Ohmori, F. Yamakura, F. Arisaka und T. Imai. „Indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase: An oxygen-sensitive iron–sulfur enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus profundus*“. *J. Biosci. Bioeng.* 114.1 (2012), 23–27.
- [269] G. C. Mead. „The Amino Acid-fermenting Clostridia“. *J. Gen. Microbiol.* 67.1 (1971), 47–56.
- [270] A. B. Hazra, A. W. Han, A. P. Mehta, K. C. Mok, V. Osadchiy, T. P. Begley und M. E. Taga. „Anaerobic biosynthesis of the lower ligand of vitamin B<sub>12</sub>“. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112.34 (2015), 10792–10797.
- [271] B. H. Kaplan und E. R. Stadtman. „Ethanolamine Deaminase, a Cobamide Coenzyme-dependent Enzyme I. Purification, Assay, and Properties of the Enzyme“. *J. Biol. Chem.* 243.8 (1968), 1787–1793.
- [272] B. H. Kaplan und E. R. Stadtman. „Ethanolamine Deaminase, a Cobamide Coenzyme-dependent Enzyme II. Physical and Chemical Properties and Interaction with Cobamides and Ethanolamine“. *J. Biol. Chem.* 243.8 (1968), 1794–1803.
- [273] S. S. Dawes, D. F. Warner, L. Tsenova, J. Timm, J. D. McKinney, G. Kaplan, H. Rubin und V. Mizrahi. „Ribonucleotide Reduction in *Mycobacterium tuberculosis*: Function and Expression of Genes Encoding Class Ib and Class II Ribonucleotide Reductases“. *Infect. Immun.* 71.11 (2003), 6124–6131.

- [274] X. Garriga, R. Eliasson, E. Torrents, A. Jordan, J. Barbé, I. Gibert und P. Reichard. „*nrdD* and *nrdG* Genes Are Essential for Strict Anaerobic Growth of *Escherichia coli*“. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229.1 (1996), 189–192.
- [275] D. T. Logan, E. Mulliez, K.-M. Larsson, S. Bodevin, M. Atta, P. E. Garnaoud, B.-M. Sjöberg und M. Fontecave. „A metal-binding site in the catalytic subunit of anaerobic ribonucleotide reductase“. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100.7 (2003), 3826–3831.
- [276] S. Kawasaki, Y. Sakai, T. Takahashi, I. Suzuki und Y. Niimura. „O<sub>2</sub> and Reactive Oxygen Species Detoxification Complex, Composed of O<sub>2</sub>-Responsive NADH:Rubredoxin Oxidoreductase-Flavoprotein A2-Desulfoferrodoxin Operon Enzymes, Rubperoxin, and Rubredoxin, in *Clostridium acetobutylicum*“. *Appl. Environ. Microbiol.* 75.4 (2009), 1021–1029.
- [277] R. H. H. van den Heuvel, D. Ferrari, R. T. Bossi, S. Ravasio, B. Curti, M. A. Vanoni, F. J. Florencio und A. Mattevi. „Structural Studies on the Synchronization of Catalytic Centers in Glutamate Synthase“. *The J. Biol. Chem.* 277.27 (2002), 24579–24583.
- [278] B. P. Girinathan, S. E. Braun und R. Govind. „*Clostridium difficile* glutamate dehydrogenase is a secreted enzyme that confers resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>“. *Microbiology* 160.Pt 1 (2014), 47–55.
- [279] M. Larocque, T. Chénard und R. Najmanovich. „A curated *C. difficile* strain 630 metabolic network: prediction of essential targets and inhibitors“. *BMC Syst. Biol.* 8.1 (2014), 117.
- [280] H. A. Barker und J. V. Beck. „*Clostridium aciduri* and *Clostridium cylindrosporum*, Organisms Fermenting Uric Acid and Some Other Purines“. *J. Bacteriol.* 43.3 (1942), 291–304.
- [281] J. C. Rabinowitz und H. A. Barker. „Purine fermentation by *Clostridium cylindrosporum*. I. Tracer experiments on the fermentation of guanine“. *The J. Biol. Chem.* 218.1 (1956), 147–160.
- [282] J. C. Rabinowitz und H. A. Barker. „Purine fermentation by *Clostridium cylindrosporum*. II. Purine transformations“. *The J. Biol. Chem.* 218.1 (1956), 161–173.
- [283] J. C. Rabinowitz. „Purine fermentation by *Clostridium cylindrosporum*. III. 4-Amino-5-imidazolecarboxylic acid and 4-aminoimidazole“. *The J. Biol. Chem.* 218.1 (1956), 175–187.
- [284] J. C. Rabinowitz und W. E. Pricer. „Purine fermentation by *Clostridium cylindrosporum*. IV. 4-Ureido-5-imidazolecarboxylic acid“. *The J. Biol. Chem.* 218.1 (1956), 189–199.
- [285] W. E. Pricer und J. C. Rabinowitz. „Purine fermentation by *Clostridium cylindrosporum*. V. Formiminoglycine“. *The J. Biol. Chem.* 222.2 (1956), 537–554.
- [286] K. Freter, J. C. Rabinowitz und B. Witkop. „Labile Stoffwechselprodukte V. Zur Biogenese Des Formiminoglycins Aus 4(5H)-Imidazolon“. *Justus Liebig's Ann. Chem.* 607.1 (1957), 174–187.
- [287] K. Uyeda und J. C. Rabinowitz. „Metabolism of Formiminoglycine. Glycine Formiminotransferase“. *The J. Biol. Chem.* 240 (1965), 1701–1710.
- [288] K. Uyeda und J. C. Rabinowitz. „Metabolism of Formiminoglycine. Formiminotetrahydrofolate Cyclodeaminase“. *The J. Biol. Chem.* 242.1 (1967), 24–31.
- [289] N. P. Curthoys und J. C. Rabinowitz. „Formyltetrahydrofolate Synthetase. Binding of Folate Substrates and Kinetics of the Reverse Reaction“. *The J. Biol. Chem.* 247.7 (1972), 1965–1971.
- [290] F. Sanger, S. Nicklen und A. R. Coulson. „DNA sequencing with chain-terminating inhibitors“. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74.12 (1977), 5463–5467.
- [291] K. Hartwich, A. Poehlein und R. Daniel. „The Purine-Utilizing Bacterium *Clostridium acidurici* 9a: A Genome-Guided Metabolic Reconsideration“. *PLoS ONE* 7.12 (2012).

- 
- [292] A. Poehlein, J. D. Montoya Solano, F. R. Bengelsdorf, B. Schiel-Bengelsdorf, R. Daniel und P. Dürre. „Draft Genome Sequence of Purine-Degrading *Clostridium cylindrosporium* HC-1 (DSM 605)“. *Genome Announc.* 3.4 (2015).
- [293] K. A. Payne, M. D. White, K. Fisher, B. Khara, S. S. Bailey *et al.* „New cofactor supports  $\alpha,\beta$ -unsaturated acid decarboxylation via 1,3-dipolar cycloaddition“. *Nature* 522.7557 (2015), 497–501.
- [294] M. D. White, K. A. Payne, K. Fisher, S. A. Marshall, D. Parker *et al.* „UbiX is a flavin prenyltransferase required for bacterial ubiquinone biosynthesis“. *Nature* 522.7557 (2015), 502–506.
- [295] J. P. Coleman, L. L. Hudson und M. J. Adams. „Characterization and Regulation of the NADP-Linked 7  $\alpha$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Gene from *Clostridium sordellii*“. *J. Bacteriol.* 176.16 (1994), 4865–4874.
- [296] T. Midtvedt und A. Norman. „Bile Acid Transformations by Microbial Strains Belonging to Genera Found in Intestinal Contents“. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 71.4 (1967), 629–638.
- [297] C. N. Falany, H. Fortinberry, E. H. Leiter und S. Barnes. „Cloning, expression, and chromosomal localization of mouse liver bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase“. *J. Lipid Res.* 38.6 (1997), 1139–1148.
- [298] J. M. Ridlon, D.-J. Kang und P. B. Hylemon. „Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria“. *J. Lipid Res.* 47.2 (2006), 241–259.
- [299] C. G. Buffie, V. Bucci, R. R. Stein, P. T. McKenney, L. Ling *et al.* „Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*“. *Nature* 517 (2015), 205–208.
- [300] J. A. Sorg. „Microbial Bile Acid Metabolic Clusters: The Bouncers at the Bar“. *Cell Host & Microbe* 16.5 (2014), 551–552.
- [301] Q. Ren, K. Chen und I. T. Paulsen. „TransportDB: a comprehensive database resource for cytoplasmic membrane transport systems and outer membrane channels“. *Nucleic Acids Res.* 35.D (2007), D274–D279.
- [302] M. J. McNulty, J. Y. Yen, B. G. Freedman und R. S. Senger. „Genome-scale modeling using flux ratio constraints to enable Metab. Eng. of clostridial metabolism *in silico*“. *BMC Syst. Biol.* 6.1 (2012), 42.
- [303] S. S. Kashaf, C. Angione und P. Lió. „Making life difficult for *Clostridium difficile*: augmenting the pathogen’s metabolic model with transcriptomic and codon usage data for better therapeutic target characterization“. *BMC Syst. Biol.* 11 (2017), 25.
- [304] R. C. Owens, C. J. Donskey, R. P. Gaynes, V. G. Loo und C. A. Muto. „Antimicrobial-Associated Risk Factors for *Clostridium difficile* Infection“. *Clin. Infect. Dis.* 46.Suppl. 1 (2008), 19–31.
- [305] E. L. Sonnhammer, G. von Heijne und A. Krogh. „A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences“. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* 6 (1998), 175–182.
- [306] G. Wang, L. F. Lo, L. S. Forsberg und R. J. Maier. „*Helicobacter pylori* Peptidoglycan Modifications Confer Lysozyme Resistance and Contribute to Survival in the Host“. *mBio* 3.6 (2012), e00409–12.
- [307] L. Häggström und C. Förberg. „Significance of an extracellular polymer for the energy metabolism in *Clostridium acetobutylicum*: A hypothesis“. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23.3-4 (1986), 234–239.
- [308] F. Sabathé, A. Bélaïch und P. Soucaille. „Characterization of the cellulolytic complex (cellulosome) of *Clostridium acetobutylicum*“. *FEMS Microbiol. Lett.* 217.1 (2002), 15–22.

- [309] H. A. Davies und S. P. Borriello. „Detection of capsule in strains of *Clostridium difficile* of varying virulence and toxigenicity“. *Microb. Pathog.* 9.2 (1990), 141–146.
- [310] T. Dapa, R. Leuzzi, Y. K. Ng, S. T. Baban, R. Adamo *et al.* „Multiple Factors Modulate Biofilm Formation by the Anaerobic Pathogen *Clostridium difficile*“. *J. Bacteriol.* 195.3 (2013), 545–555.
- [311] J. Monod. „The Growth of Bacterial Cultures“. *Annu. Rev. Microbiol.* 3.1 (1949), 371–394.
- [312] T. Rühle und D. Leister. „Assembly of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthases“. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1847.9 (2015), 849–860.
- [313] L. Shaw und P. C. Engel. „The suicide inactivation of ox liver short-chain acyl-CoA dehydrogenase by propionyl-CoA. Formation of an FAD adduct“. *Biochem. J.* 230.3 (1985), 723–731.
- [314] W. Lehnert und J. O. Sass. „Glutaconyl-CoA is the main toxic agent in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency (glutaric aciduria type I)“. *Med. Hypotheses* 65.2 (2005), 330–333.
- [315] W. Jiang, J. Hermolin und R. H. Fillingame. „The preferred stoichiometry of c subunits in the rotary motor sector of *Escherichia coli* ATP synthase is 10“. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98.9 (2001), 4966–4971.
- [316] M. Toei, C. Gerle, M. Nakano, K. Tani, N. Gyobu *et al.* „Dodecamer rotor ring defines H<sup>+</sup>/ATP ratio for ATP synthesis of prokaryotic V-ATPase from *Thermus thermophilus*“. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104.51 (2007), 20256–20261.
- [317] H. Stahlberg, D. J. Müller, K. Suda, D. Fotiadis, A. Engel, T. Meier, U. Matthey und P. Dimroth. „Bacterial Na<sup>+</sup>-ATP synthase has an undecameric rotor“. *EMBO Rep.* 2.3 (2001), 229–233.
- [318] D. Pogoryelov, J. Yu, T. Meier, J. Vonck, P. Dimroth und D. J. Muller. „The c<sub>15</sub> ring of the *Spirulina platensis* F-ATP synthase: F<sub>1</sub>/F<sub>0</sub> symmetry mismatch is not obligatory“. *EMBO Rep.* 6.11 (2005), 1040–1044.
- [319] H. Seelert, N. A. Dencher und D. J. Müller. „Fourteen Protomers Compose the Oligomer III of the Proton-rotor in Spinach Chloroplast ATP Synthase“. *J. Mol. Biol.* 333.2 (2003), 337–344.
- [320] J. M. W. Meyer zu Tittingdorf, S. Rexroth, E. Schäfer, R. Schlichting, C. Giersch, N. A. Dencher und H. Seelert. „The stoichiometry of the chloroplast ATP synthase oligomer III in *Chlamydomonas reinhardtii* is not affected by the metabolic state“. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1659.1 (2004), 92–99.
- [321] J. L. Giel, J. A. Sorg, A. L. Sonenshein und J. Zhu. „Metabolism of Bile Salts in Mice Influences Spore Germination in *Clostridium difficile*“. *PLOS ONE* 5.1 (2010), e8740.
- [322] M. M. Nerandzic und C. J. Donskey. „Triggering Germination Represents a Novel Strategy to Enhance Killing of *Clostridium difficile* Spores“. *PLOS ONE* 5.8 (2010), e12285.
- [323] D. He, S. Sougioultzis, S. Hagen, J. Liu, S. Keates, A. C. Keates, C. Pothoulakis und J. T. LaMont. „*Clostridium difficile* Toxin A Triggers Human Colonocyte IL-8 Release via Mitochondrial Oxygen Radical Generation“. *Gastroenterology* 122.4 (2002), 1048–1057.

# Abkürzungsverzeichnis

**BTM** Biotrockenmasse

**CDMM** *C. difficile* Minimalmedium, engl. *Clostridium difficile minimal medium*

**CDI** *C. difficile*-Infektion

**CDS** codierende DNA-Sequenzen, engl. coding sequences

**CoA** Coenzym A

**DFBA** dynamische Flussbilanzanalyse

**DSMZ** Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

**FBA** Flussbilanzanalyse

**FVA** Flussvarianzanalyse

**GAM** wachstumsassoziierte Erhaltungsenergie, engl. *growth-associated maintenance energy*

**GC/MS** Gaschromatographie und Massenspektrometrie

**LC/FLD** Flüssigkeitschromatographie und Fluoreszenzdetektion, engl. *liquid chromatography and fluorescence detection*

**LC/MS** Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie, engl. *liquid chromatography and mass spectrometry*

**MDM** definiertes Minimalmedium, engl. *minimal defined medium*

**NFN-Oxidoreduktase** NADH-abhängige Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase

**NGAM** nicht-wachstumsassoziierte Erhaltungsenergie, engl. *non-growth-associated maintenance energy*

**OD<sub>600</sub>** optische Dichte bei 600 nm

**TCA-Zyklus** Tricarbonsäurezyklus, engl. *tricarboxylic acid cycle*

# Tabellenverzeichnis

2.1	Redoxpotentiale von Cofaktoren. . . . .	21
2.2	Biomassenzusammensetzung von <i>C. difficile</i> . . . . .	23
3.1	Gene des Lactatmetabolismus von <i>C. difficile</i> 630 $\Delta$ <i>erm</i> . . . . .	31
3.2	Das Enzym von <i>C. difficile</i> ist keine Glycerin-Dehydratase. . . . .	34
3.3	Substrate der Indolpyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase . . . . .	36
3.4	Vorgeschlagene Gene für den Purin-Abbau in <i>G. acidurici</i> 9a. . . . .	42
3.5	Sowohl notwendige als auch variable Reaktionen in <i>iHD992</i> . . . . .	45
3.6	Vergleich der Modelle <i>iHD992</i> , <i>iMLTC806cdf</i> und <i>icdf834</i> . . . . .	49
3.7	Vorgeschlagenes Operon zur Synthese des Exopolysaccharids. . . . .	54
3.8	Bildung des Exopolysaccharids in MDM und CDMM. . . . .	56
A.1	DNA von <i>C. difficile</i> 630 $\Delta$ <i>erm</i> im Modell <i>iHD992</i> . . . . .	A-1
A.2	RNA von <i>C. difficile</i> 630 $\Delta$ <i>erm</i> im Modell <i>iHD992</i> . . . . .	A-1
A.3	Aminosäurebedarf von <i>C. difficile</i> 630 $\Delta$ <i>erm</i> . . . . .	A-2
A.4	Lipide von <i>C. difficile</i> 630 $\Delta$ <i>erm</i> im Modell <i>iHD992</i> . . . . .	A-2
A.5	Lipoteichonsäure von <i>C. difficile</i> 630 $\Delta$ <i>erm</i> im Modell <i>iHD992</i> . . . . .	A-3
A.6	Peptidoglycan von <i>C. difficile</i> 630 $\Delta$ <i>erm</i> im Modell <i>iHD992</i> . . . . .	A-3
A.7	Polysaccharid II von <i>C. difficile</i> 630 $\Delta$ <i>erm</i> im Modell <i>iHD992</i> . . . . .	A-3
A.8	Metabolit-Pool von <i>C. difficile</i> 630 $\Delta$ <i>erm</i> im Modell <i>iHD992</i> . . . . .	A-4
A.9	Ionen-Pool von <i>C. difficile</i> 630 $\Delta$ <i>erm</i> im Modell <i>iHD992</i> . . . . .	A-5
A.10	Verwendete Substratkonzentrationen und OD <sub>600</sub> in MDM-Kulturen .	A-5
A.11	Verwendete Substratkonzentrationen und OD <sub>600</sub> in CDMM-Kulturen	A-6
A.12	Sequenzanalyse der Proteine des Lactat-Metabolismus. . . . .	A-9
A.13	Sequenzanalyse der Gene des Purin-Abbauwegs von <i>G. acidurici</i> 9a. .	A-10
A.14	Vorgeschlagene Gene für den Purin-Abbau in <i>C. cylindrosporum</i> HC-1.	A-11
A.15	Mögliche Targets in <i>C. difficile</i> . . . . .	A-11
A.16	Ursprung der Kohlenstoffs im Zentralmetabolismus . . . . .	A-15
A.17	Vorgeschlagene Proteine zur Synthese der Exopolysaccharide. . . . .	A-15



# Abbildungsverzeichnis

1.1	Der Rnf-Komplex und Elektronen-Bifurkation. . . . .	6
1.2	Klassischer oxidativer Stickland-Weg. . . . .	8
1.3	Klassischer reduktiver Stickland-Weg. . . . .	8
1.4	Der Wood-Ljungdahl-Weg. . . . .	10
1.5	Fermentation zu Butanoat. . . . .	11
1.6	Beispiel für ein einfaches stöchiometrisches Modell. . . . .	14
1.7	Funktionsweise der FBA. . . . .	15
2.1	Vorgehen bei der Vorhersage der Genfunktion. . . . .	19
3.1	Reannotation von <i>C. difficile</i> 630. . . . .	27
3.2	Der TCA-Zyklus von <i>C. difficile</i> . . . . .	29
3.3	<i>larC</i> (CDIF630erm_00317) ist kein Pseudogen. . . . .	32
3.4	Modell der putativen 4-Hydroxyprolin-Dehydratase von <i>C. difficile</i> . . . . .	33
3.5	Postulierter Abbauweg von 4-Hydroxyprolin zu L-Prolin in <i>C. difficile</i> . . . . .	35
3.6	Detoxifikation reaktiver Sauerstoffspezies. . . . .	40
3.7	Modifikationen des Cholats durch <i>C. difficile</i> und <i>C. scindens</i> . . . . .	44
3.8	Variabilität und Notwendigkeit der Aspartat-Transaminase. . . . .	46
3.9	Aminosäuredegradation über Stickland-Wege in <i>iHD992</i> . . . . .	47
3.10	Ursprung der Kohlenstoffs im Zentralmetabolismus. . . . .	53
3.11	O-Acetylierung von Polysacchariden. . . . .	55
3.12	Zeitaufgelöste Simulation der Exopolysaccharidproduktion in MDM. . . . .	57
3.13	Beträge der stärksten Reaktionsflüsse in MDM. . . . .	60
3.14	Konstanter Fluss trotz linearem Wachstum. . . . .	62
3.15	Zeitaufgelöste Simulation von <i>C. difficile</i> 630 $\Delta$ <i>erm</i> in CDMM. . . . .	65
3.16	Produktion von Alkansäuren <i>in silico</i> und <i>in vivo</i> . . . . .	66
3.17	Die Oxidation von NADH in MDM. . . . .	68
3.18	Beladung von Tetrahydrofolat durch Aminosäuren in <i>iHD992</i> . . . . .	68
3.19	Die Oxidation von NADH in CDMM. . . . .	69
3.20	Der Wood-Ljungdahl-Weg in CDMM. . . . .	70
3.21	Ursprung des ATP bei Wachstum in MDM. . . . .	71
3.22	Bildung von Acetyl-CoA bei 3 h Wachstum in MDM. . . . .	72

3.23	Ursprung des ATP bei Wachstum in CDMM. . . . .	73
3.24	Die ATP-Synthase von <i>C. difficile</i> . . . . .	75
A.1	Abbaupfad von Xanthin in <i>G. acidurici</i> und <i>C. cylindrosporum</i> . . . .	A-16
A.2	OD <sub>600</sub> und Wachstumsrate von <i>C. difficile</i> 630 $\Delta$ <i>erm</i> in MDM. . . .	A-17
A.3	OD <sub>600</sub> und Wachstumsrate von <i>C. difficile</i> 630 $\Delta$ <i>erm</i> in CDMM. . . .	A-17

# Anhang

## Tabellen und Abbildungen

**Tabelle A.1: DNA von *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* im Modell *i*HD992.** Die Anzahl bezieht sich auf ein Chromosom.

Komponente	Anzahl	Anteil	Für DNA [mmol/g <sub>RNA</sub> ]
AMP (ATP)	3044566	0,35459	1,15183
GMP (GTP)	1248482	0,14541	0,47233
CMP (CTP)	1248482	0,14541	0,47233
TMP (TTP)	3044566	0,35459	1,15183
Methylierung <sup>a</sup>	8000	0,00039	0,00303

<sup>a</sup>: Abgeschätzt basierend auf den Erkenntnissen von Eijk *et al.* [1].

**Tabelle A.2: RNA von *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* im Modell *i*HD992.** Die Anzahl bezieht sich auf ein Chromosom. Verhältnisse der RNAs übernommen von *E. coli* [2].

Komponente	rRNA		tRNA		mRNA <sup>a</sup>	Für RNA [mmol/g <sub>RNA</sub> ]
	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil	Anteil	
AMP (ATP)	14915	0,27661	1409	0,19977	0,35459	0,83394
GMP (GTP)	11726	0,21747	1579	0,22388	0,14541	0,66708
CMP (CTP)	15954	0,29588	2134	0,30257	0,14541	0,90005
UMP (UTP)	11326	0,21005	1931	0,27378	0,35459	0,69615
Methylierung <sup>b</sup>	360	0,00668	180	0,02552		0,02785
Hydrierung <sup>b</sup>	24	0,00045	90	0,01276		0,00657

<sup>a</sup>: Abgeschätzt über GC-Gehalt des Genoms von *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm*.  
<sup>b</sup>: Basierend auf der Datenbank MODOMICS [3] (23S rRNA: *E. coli*, 16S rRNA: *C. acetobutylicum*, tRNA: *B. subtilis*).

**Tabelle A.3: Aminosäurebedarf von *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm*.** AS: Aminosäure, PG: Peptidoglycan, DAP: *meso*-Diaminopimelat. Die Quantifizierung der Aminosäuren wurde von Sabine Will durchgeführt.

AS	Masse [g]		Bedarf [mmol]	Für PG [mmol]	Für Protein [mmol]	Für Protein [mmol/g <sub>Protein</sub> ]
	Gemessen	Verwendet				
Gly	0,02588 $\pm$ 0,00198	0,02588	0,34471	0,00655	0,01929	0,59772
Ala	0,05105 $\pm$ 0,00419	0,05105	0,57297	0,23278	0,02418	0,63120
Val	0,02636 $\pm$ 0,00212	0,02636	0,22501		0,02231	0,44284
Leu	0,04064 $\pm$ 0,00321	0,04064	0,30985		0,03506	0,62167
Ile	0,02468 $\pm$ 0,00205	0,02468	0,18818		0,02129	0,37755
Ser	0,02349 $\pm$ 0,00180	0,02349	0,22349		0,01946	0,43067
Thr	0,02657 $\pm$ 0,00207	0,02657	0,22307		0,02255	0,44035
Phe	0,02099 $\pm$ 0,00165	0,02099	0,12706		0,01870	0,26329
Tyr	0,01839 $\pm$ 0,00114	0,01839	0,10151		0,01656	0,21261
Trp	nicht detektiert	0,00610	0,02986		0,00556	0,06332
Cys	nicht detektiert	0,00610	0,05034		0,00519	0,09966
Met	0,00512 $\pm$ 0,00022	0,00512	0,03432		0,00450	0,07019
Lys	0,04752 $\pm$ 0,00655	0,04752	0,32282		0,04170	0,07019
Arg	0,02303 $\pm$ 0,00265	0,02303	0,13145		0,02066	0,27429
His	0,00762 $\pm$ 0,00133	0,00762	0,04913		0,00674	0,10099
Asp	0,06308 $\pm$ 0,00471	0,03154	0,23877		0,02724	0,47959
Glu	0,10526 $\pm$ 0,00849	0,08421	0,57629	0,14451	0,05531	0,88041
Asn	nicht detektiert	0,03154	0,23873		0,02724	0,47953
Gln	nicht detektiert	0,02105	0,14404		0,01846	0,29371
Pro	0,02120 $\pm$ 0,00250	0,02120	0,18411		0,01788	0,36118
Sec	nicht detektiert	0,00008	0,00045		0,00007	0,00094
DAP	0,02739 $\pm$ 0,00130	0,02739	0,14401	0,14401 <sup>a</sup>	0,00000	0,00000
$\Sigma$	0,55828	0,57055			0,42997	7,78062

<sup>a</sup>: Ergibt einen Anteil des Peptidoglycans an der Biomasse von 14,5 %

**Tabelle A.4: Lipide von *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* im Modell *i*HD992.**

Komponente	Molare Masse <sup>a</sup> [g/mol]	Anteil <sup>b</sup>	Für Lipid [mmol/g <sub>Lipid</sub> ]
Phosphatidylglycerol	722,17	0,5	0,69236
Cardiolipin	1352,24	0,5	0,36976

<sup>a</sup>: Nur Phosphatidylglycerol-Analoga in Isolaten von *C. difficile* [4].  
<sup>b</sup>: Durchschnittliche Kettenlänge: 16,246; Anteil Ungesättigt: 0,164 [5].

**Tabelle A.5: Lipoteichonsäure von *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* im Modell iHD992.** LTA: Lipoteichonsäure.

Komponente	Verhältnis <sup>a</sup>	Molare Masse [g/mol <sub>LTA</sub> ]	Für LTA [mmol/g <sub>LTA</sub> ]
UDP-N-acetyl-D-glucose	10,15	2062,03	2,59231
Deacetylierung	1,22	-51,38	0,31221
2-Phospho-D-glycerat	5,07	441,72	1,29615
UDP-Glucose	3,00	486,44	0,76635
1,2-Diacyl-sn-glycerin	1,00	575,16	0,25545
ATP	5,07	400,71	1,29615

<sup>a</sup>: Zusammensetzung und Kettenlänge bestimmt von Reid *et al.* [6].

**Tabelle A.6: Peptidoglycan von *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* im Modell iHD992.** PG: Peptidoglycan.

Komponente	Verhältnis <sup>a</sup>	Molare Masse [g/mol <sub>Monomer PG</sub> ]	Für PG [mmol/g <sub>PG</sub> ]
L-alanin	1,000	71,08	1,17720
D-glutamat	1,000	128,11	1,17720
Diaminopimelat	0,997	171,59	1,17312
D-alanin	0,611	43,42	0,71910
Glycin	0,045	2,59	0,05335
Deacetylierung	0,928	-39,00	1,09224
Andere Modifikationen	0,319	-5,75	0,37591
UDP-N-acetyl-D-glucosamin	1,000	203,20	1,17720
UDP-N-acetylmuramat	1,000	274,26	1,17720

<sup>a</sup>: Zusammensetzung für *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* bestimmt von Peltier *et al.* [7].

**Tabelle A.7: Polysaccharid II von *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* im Modell iHD992.** PSII: Polysaccharid II.

Komponente	Verhältnis <sup>a</sup>	Molare Masse [g/mol <sub>Monomer PSII</sub> ]	Für PSII [mmol/g <sub>PSII</sub> ]
UDP-N-acetyl-D-galactosamin	2	406,39	1,76376
UDP-D-glucose	3	486,44	2,64564
GDP-D-mannose	1	241,12	0,88188

<sup>a</sup>: Zusammensetzung bestimmt von Ganeshapillai *et al.* [8].

**Tabelle A.8: Metabolit-Pools von *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* im Modell iHD992.** MB: Metabolite.

Komponente	Verhältnis	Molare Masse [g/mol <sub>MB</sub> ]	Für Metabolit-Pool [mmol/g <sub>MB</sub> ]
ATP <sup>a</sup>	3,2656	102,87	0,33818
ADP <sup>a</sup>	0,8190	21,75	0,08481
AMP <sup>a</sup>	0,2988	6,46	0,03094
Acetyl-CoA <sup>a</sup>	1,6736	84,41	0,17332
FAD <sup>a</sup>	0,6438	31,54	0,06667
NAD <sup>+</sup> <sup>a</sup>	1,6046	66,55	0,16617
NADH <sup>a</sup>	0,3393	14,09	0,03514
NADP <sup>+</sup> <sup>a</sup>	0,0042	0,19	0,0043
NADPH <sup>a</sup>	0,2415	11,21	0,02501
ppGpp	0,6438	24,11	0,06667
Tetrahydropteroyltriglutamat	0,6438	28,20	0,06667
Di-trans,octa-cis-undecaprenyl-PP	0,6438	37,25	0,06667
Thiamindiphosphat	0,6438	17,02	0,06667
Adenosylcobalamin	0,6438	63,67	0,06667
Mg-protoporphyrin	0,6438	23,50	0,06667
MoO <sub>2</sub> -molybdopterin	0,6438	20,93	0,06667
Biotin	0,6438	9,81	0,06667
Me-Thr-P-GluNAc-FliC	0,6438	11,28	0,06667
Pyridoxin-5'-phosphat	0,6438	9,96	0,06667
L-threonylcarbamoyladenylat	0,6438	19,76	0,06667

<sup>a</sup>: *C. acetobutylicum* in der säurebildenden Phase [9].

**Tabelle A.9: Ionen-Pool von *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* im Modell iHD992.**

Komponente	Anteil <sup>a</sup>	Molare Masse [g/mol <sub>Ion</sub> ]	Für Ionen-Pool [mmol/g <sub>Ionen</sub> ]
K <sup>+</sup> <sup>a</sup>	0,860	33,62	20,96743
Mg <sup>2+</sup> <sup>a</sup>	0,077	1,87	1,87732
Fe <sup>3+</sup> <sup>a</sup>	0,006	0,34	0,14628
Ca <sup>2+</sup> <sup>a</sup>	0,004	0,16	0,09752
Phosphat <sup>a</sup>	0,043	4,13	1,04837
Diphosphat <sup>a</sup>	0,005	0,87	0,12190
Na <sup>+</sup>	0,001	0,02	0,02438
Fe <sup>2+</sup>	0,001	0,06	0,02438
Ni <sup>2+</sup>	0,001	0,06	0,02438
Cd <sup>2+</sup>	0,001	0,11	0,02438
Zn <sup>2+</sup>	0,001	0,07	0,02438

<sup>a</sup>: Zusammensetzung von *B. subtilis* [10].

**Tabelle A.10: Verwendete Substratkonzentrationen und OD<sub>600</sub> in MDM-Kulturen.** Die Funktionen wurden mittels OriginPro 2015G erstellt. Experimentellen Daten von MDM-Kulturen mit *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* wurden der Literatur [11] entnommen.

Funktion	Parameter	Zeit [h]	R <sup>2</sup>
$OD(t) = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{(1 + ((t_0/t)^h)^s)}$	$A_1 = 0,00500$ $A_2 = 0,39989$ $t_0 = 9,09315$ $h = 12,89192$ $s = 0,10158$	0,00 - 12,0	0,99234
$Cys_{rel}(t) = a + b_1 t + b_2 t^2 + b_3 t^3$	$a = 0,99488$ $b_1 = -0,16893$ $b_2 = -0,01235$ $b_3 = 0,00231$	0,00 - 6,67	0,92454
$Ile_{rel}(t) = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{(1 + e^{(t-t_0)/dt})}$	$A_1 = 0,99257$ $A_2 = 0,14788$ $t_0 = 5,13433$ $dt = 1,53344$ $span = 0,83222$ $EC_{50} = 169,8$	0,00 - 12,0	0,98845
$Leu_{rel}(t) = a + b \cdot t$	$a = 0,96612$ $b = -0,02369$	0,00 - 5,25	0,48804
$Leu_{rel}(t) = A_1 \cdot e^{-t/x_1} + y_0$	$y_0 = 0,27023$ $A_1 = 35,72743$ $x_1 = 1,20063$ $k = 0,83289$ $\tau = 0,83222$	5,25 - 12,0	0,87374
$Met_{rel}(t) = a + b_1 t + b_2 t^2 + b_3 t^3$	$a = 1,01491$ $b_1 = -0,07017$ $b_2 = -0,07927$ $b_3 = 0,01041$	0,00 - 4,67	0,87616
$Pro_{rel}(t) = A_1 \cdot e^{-t/x_1} + y_0$	$y_0 = 1,31687$ $A_1 = -0,32291$ $x_1 = -11,33440$ $k = -0,08823$ $\tau = -7,85641$	0,00 - 5,25	0,99559

Tabelle A.10 – Fortsetzung

Funktion	Parameter	Zeit [h]	R <sup>2</sup>
$Pro_{rel}(t) = A_1 \cdot e^{-t/x_1} + y_0$	$y_0 = 0,02347$ $x_1 = 1,07132$ $\tau = 0,74259$ $A_1 = 57,12713$ $k = 0,93342$	5,25 - 12,0	0,95409
$Trp_{rel}(t) = A_1 \cdot e^{-t/x_1} + y_0$	$y_0 = 1,34255$ $x_1 = -6,93747$ $\tau = -4,70769$ $A_1 = -0,37572$ $k = -0,14414$	0,00 - 8,50	0,98919
$Val_{rel}(t) = a + b \cdot t$	$a = 0,98328$ $b = -0,02910$	0,00 - 5,25	0,84721
$Val_{rel}(t) = A_1 \cdot e^{-t/x_1} + y_0$	$y_0 = 0,32975$ $x_1 = 0,88397$ $\tau = 0,61272$ $A_1 = 196,70196$ $k = 1,13126$	5,25 - 12,0	0,97966
$Gluc_{rel}(t) = a + b_1 \cdot t + b_2 \cdot t^2$	$a = 0,98356$ $b_2 = -0,01745$ $b_1 = -0,06647$	0,00 - 5,25	0,99923
$Gluc_{rel}(t) = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{(1 + ((t_0/t)^h)^s)}$	$A_1 = 0,05196$ $t_0 = 15,87124$ $s = 1225,95789$ $A_2 = 2,17470$ $h = -9,82418$	5,25 - 12,0	0,99007

**Tabelle A.11: Verwendete Substratkonzentrationen und OD<sub>600</sub> in CDMM-Kulturen.** Die Funktionen wurden mittels OriginPro 2015G erstellt. Experimentellen Daten von CDMM-Kulturen mit *C. difficile* 630 $\Delta_{erm}$  wurden der Literatur [11] entnommen.

Funktion	Parameter	Zeit [h]	R <sup>2</sup>
$OD(t) = A_1 \cdot e^{-t/x_1} + y_0$	$y_0 = -0,04045$ $x_1 = -1,04652$ $\tau = 0,72539$ $A_1 = 0,04110$ $k = 0,955552$	0,00 - 2,00	0,95351
$OD(t) = A_1 \cdot e^{-t/x_1} + y_0$	$y_0 = 0,00000$ $x_1 = -1,32201$ $\tau = 0,91635$ $A_1 = 0,04757$ $k = 0,75642$	1,00 - 3,40	0,89764
$OD(t) = a + b \cdot t$	$a = -0,02090$ $b = 0,19075$	3,50 - 8,00	0,86917
$Cys_{rel}(t) = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{(1 + e^{(t-t_0)/dt})}$	$A_1 = 0,96740$ $t_0 = 2,03742$ $span = 0,86195$ $A_2 = 0,10545$ $dt = 0,34962$ $EC_{50} = 7,671$	0,00 - 3,50	0,99883



Tabelle A.11 – Fortsetzung

Funktion	Parameter		Zeit [h]	R <sup>2</sup>
$Cys_{rel}(t) = a + b \cdot t$	$a = 0,75591$	$b = -0,18272$	3,50 - 4,00	0,99303
$Ile_{rel}(t) = A_1 \cdot e^{-t/x_1} + y_0$	$y_0 = 1,12163$ $x_1 = -1,58509$ $\tau = -1,09870$	$A_1 = -0,10272$ $k = -0,63088$	0,00 - 3,50	0,92790
$Ile_{rel}(t) = a + b \cdot t$	$a = 0,58216$	$b = -0,12008$	3,50 - 4,50	0,76521
$Leu_{rel}(t) = a + b_1 t + b_2 t^2 + b_3 t^3$	$a = 0,99344$ $b_2 = 0,03270$	$b_1 = -0,10645$ $b_3 = -0,02375$	0,00 - 3,50	0,96144
$Leu_{rel}(t) = a + b \cdot t$	$a = 0,31681$	$b = -0,08192$	3,50 - 3,75	-
$Met_{rel}(t) = A_1 \cdot e^{-t/x_1} + y_0$	$y_0 = 0,94952$ $x_1 = -1,17058$ $\tau = -0,81139$	$A_1 = -0,03582$ $k = -0,85428$	0,00 - 3,75	0,99105
$Pro_{rel}(t) = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{(1 + e^{(t-t_0)/dt})}$	$A_1 = 1,31883$ $t_0 = 1,75619$ $span = 1,59886$	$A_2 = -0,28003$ $dt = 1,19337$ $EC_{50} = 5,790$	0,00 - 3,50	0,99472
$Trp_{rel}(t) = A_1 \cdot e^{-t/x_1} + y_0$	$y_0 = 1,71645$ $x_1 = -9,26705$ $\tau = -6,42343$	$A_1 = -0,72456$ $k = -0,10791$	0,00 - 5,25	0,99083
$Val_{rel}(t) = A_1 \cdot e^{-t/x_1} + y_0$	$y_0 = 1,02750$ $x_1 = -2,33158$ $\tau = -1,61613$	$A_1 = -0,09812$ $k = -0,42889$	0,00 - 5,25	0,99051
$Ala_{rel}(t) = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{(1 + e^{(t-t_0)/dt})}$	$A_1 = 0,96241$ $t_0 = 2,44879$ $span = 0,63071$	$A_2 = 0,33169$ $dt = 0,41349$ $EC_{50} = 11,17$	0,00 - 3,50	0,96921
$Ala_{rel}(t) = a + b_1 \cdot t + b_2 \cdot t^2$	$a = -1,07653$ $b_2 = -0,10834$	$b_1 = 0,80434$	3,50 - 5,25	0,93296
$Arg_{rel}(t) = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{(1 + e^{(t-t_0)/dt})}$	$A_1 = 1,05930$ $t_0 = 2,41832$ $span = 0,69836$	$A_2 = 0,36094$ $dt = 0,74592$ $EC_{50} = 11,23$	0,00 - 11,0	0,99115
$Asp_{rel}(t) = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{(1 + e^{(t-t_0)/dt})}$	$A_1 = 0,99783$ $t_0 = 2,06163$ $span = 0,60847$	$A_2 = 0,38936$ $dt = 0,25586$ $EC_{50} = 7,859$	0,00 - 3,50	0,99395

Tabelle A.11 – Fortsetzung

Funktion	Parameter		Zeit [h]	R <sup>2</sup>
$Asp_{rel}(t) = A_1 \cdot e^{-t/x_1} + y_0$	$y_0 = 0,17968$ $x_1 = 0,43935$ $\tau = 0,30453$	$A_1 = 619,04429$ $k = 2,27611$	3,50 - 5,25	0,97811
$Gly_{rel}(t) = A_1 \cdot e^{-t/x_1} + y_0$	$y_0 = 1,34096$ $x_1 = -2,87096$ $\tau = -1,99000$	$A_1 = -0,32757$ $k = -0,34832$	3,50 - 4,00	0,99942
$Phe_{rel}(t) = A_1 \cdot e^{-t/x_1} + y_0$	$y_0 = 1,11495$ $x_1 = -1,62541$ $\tau = -1,12651$	$A_1 = -0,09174$ $k = -0,61530$	0,00 - 4,00	0,99718
$Ser_{rel}(t) = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{(1 + e^{(t-t_0)/dt})}$	$A_1 = 0,95887$ $t_0 = 2,83070$ $span = 0,99020$	$A_2 = -0,03133$ $dt = 0,23137$ $EC_{50} = 16,96$	0,00 - 3,50	0,99801
$Ser_{rel}(t) = a + b \cdot t$	$a = 0,13832$	$b = -0,03361$	3,50 - 3,75	-
$Thr_{rel}(t) = A_1 \cdot e^{-t/x_1} + y_0$	$y_0 = 2,57581$ $x_1 = -9,94436$ $\tau = -6,89291$	$A_1 = -1,49028$ $k = -0,10056$	0,00 - 5,25	0,96896
$Tyr_{rel}(t) = A_1 \cdot e^{-t/x_1} + y_0$	$y_0 = 1,39161$ $x_1 = -4,42492$ $\tau = -3,06712$	$A_1 = -0,39354$ $k = -0,22599$	0,00 - 4,50	0,96196
$His_{rel}(t) = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{(1 + e^{(t-t_0)/dt})}$	$A_1 = 1,00560$ $t_0 = 2,90486$ $span = 0,76985$	$A_2 = 0,23575$ $dt = 0,75226$ $EC_{50} = 18,26$	0,00 - 11,0	0,99096
$Gluc_{rel}(t) = a + b \cdot t$	$a = 0,99484$	$b = -0,02424$	0,00 - 3,00	0,69519
$Gluc_{rel}(t) = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{(1 + e^{(t-t_0)/dt})}$	$A_1 = 0,95438$ $t_0 = 4,06080$ $span = 0,86008$	$A_2 = 0,09430$ $dt = 0,35287$ $EC_{50} = 58,02$	1,50 - 5,50	0,99589

**Tabelle A.12: Sequenzanalyse der Proteine des Lactat-Metabolismus.** Verwendet wurden BLASTp [12] und InterProScan [13]. Der Genlocus für *C. difficile* 630 $\Delta_{erm}$  ist ohne Präfix (CDIF630erm\_) angegeben.

Genlocus	Strang	Treffer	Funktion	EC-Nummer
00316	+	F9UST0	Ni <sup>2+</sup> -Ladeprotein LarB	3.6.1.8
00317	+	F9UST1/2 [14]	Ni <sup>2+</sup> -Carrierprotein LarC	
00921	+	IPR003673	Acetyl-CoA:Lactat-CoA-Transferase	2.8.3.-
00922	+	G3KIM8	Acryloyl-CoA-Dehydrogenase	} 1.3.98.-
00923	+	G3KIM7	Elektronentransportprotein EtfB	
00924	+	G3KIM6	Elektronentransportprotein EtfA	
01317	+	IPR000524	Transkriptionsregulator, GntR-Familie	
01318	+	F9USS9	Lactat-Racemase	5.1.2.1
01319	+	H6LBS1	Lactat-Dehydrogenase	} 1.1.98.-
01320	+	H6LBB1	Elektronentransportprotein EtfA	
01321	+	H6LBB0	Elektronentransportprotein EtfB	
01977	+	F9UST4	Ni <sup>2+</sup> -Übertragungsprotein LarE	
02396	+	IPR011304	L-lactat-Dehydrogenase	1.1.1.27

**Tabelle A.13: Sequenzanalyse der Gene des Purin-Abbauwegs von *G. acridurici* 9a.** Verwendet wurden BLASTp [12] und InterProScan [13].

Genlocus	Strang	Treffer	Funktion	EC-Nummer
Curi_c03010	+	IPR004227	Formiminotransferase	2.1.2.-
		Q99XR4	Glutamat-Formimidoyltransferase	2.1.2.5/6.3.3.2
Curi_c03020	+	IPR000559	Format-Tetrahydrofolat-Ligase	6.3.4.3
Curi_c29030	–	IPR006679	Adenin-Deaminase	3.5.4.2
Curi_c29040	–	IPR004992	EutN/CcmL-Homolog	
Curi_c29050	–	IPR003382	Flavoprotein	
Curi_c29060	–	IPR000249	Mikrocompartment-Protein	
Curi_c29070	–	IPR000249	Mikrocompartment-Protein	
Curi_c29080	–			
Curi_c29090	–	IPR000249	Mikrocompartment-Protein	
Curi_c29100	–	P0AAB4	4-Hydroxy-3-polyprenylbenzoat-Decarboxylase	4.1.1.98
Curi_c29110	–	IPR004507	Flavin-Prenyltransferase	2.5.1.129
Curi_c29120	–	P32400	N-carbamoylsarcosin-Amidase	3.5.1.59
		IPR004722	Dihydroorotase	3.5.2.3
Curi_c29130	–	Q9KAH8	Allantoinase	3.5.2.5
Curi_c29140	+	IPR007325	Arylformamidase	3.5.1.9
Curi_c29150	–	IPR012914	Purinkatabolismus Domäne (PurC-ähnlich)	
		Q9YH58	Formiminotetrahydrofolat-Cyclohydrolase	4.3.1.4
Curi_c29160	–	Q49135	Methenyltetrahydrofolat-Cyclohydrolase	3.5.4.9
Curi_c29170	+	IPR006042	Xanthin/Uracil-Permease	
Curi_c29180	+	IPR006042	Xanthin/Uracil-Permease	
Curi_c29190	+	IPR000292	Format/Nitrit-Transporter	

**Tabelle A.14: Vorgeschlagene Gene für den Purin-Abbau in *C. cylindrosporum* HC-1.**

Genlocus	Strang	Vorgeschlagene Funktion	EC-Nummer
CLCY_4c00590	–	Formiminotetrahydrofolat-Cyclodeaminase	4.3.1.4
		Methenyltetrahydrofolat-Cyclohydrolase	3.5.4.9
[...]			
CLCY_4c00740	–	Adenin-Deaminase	3.5.4.2
CLCY_4c00750	–	Porenbildendes Mikrocompartment-Protein	
CLCY_4c00760	–	4-Aminoimidazol-Deaminase	3.5.8.4
CLCY_4c00770	–	Mikrocompartment-Protein	
CLCY_4c00780	–	Mikrocompartment-Protein	
CLCY_4c00790	–	Putatives Mikrocompartment-Protein	
CLCY_4c00800	–	Mikrocompartment-Protein	
CLCY_4c00810	–	4-Aminoimidazolcarboxylat-Decarboxylase	4.1.1.-
CLCY_4c00820	–	Flavin-Prenyltransferase	2.5.1.129
CLCY_4c00830	–	4-Ureido-imidazolcarboxylate-Amidohydrolase	3.5.1.-
CLCY_4c00840	–	Xanthin-Amidohydrolase	3.5.2.-
CLCY_4c00850	–	Format-Tetrahydrofolat-Ligase	6.3.4.3
CLCY_4c00860	–	Glycin-Formimidoyltransferase	2.1.2.4
CLCY_4c00870	+	4-Imidazonase	3.5.2.-
CLCY_4c00880	–	Purinkatabolismus-Reguator	
CLCY_4c00890	+	Purin-Permease	
CLCY_4c00900	+	Purin-Permease	

**Tabelle A.15: Mögliche Targets in *C. difficile*.** Aufgelistet sind alle von Larocque *et al.* [15] als für *C. difficile* 630 essentiell eingestufteten Gene aufgelistet. Der Genlocus für *C. difficile* 630 $\Delta$ *erm* ist ohne Präfix (CDIF630erm\_) angegeben. MF: humanes Funktionshomolog laut Larocque *et al.* [15] existent, E: Vom Modell *i*HD992 als essentiell vorhergesagt.

Genlocus	H	Reaktion in <i>i</i> HD992	E
00109	+	methylethritol-phosphate-pathway/3_2.7.7.60_2.7.7.60-RXN	+
00110	+	methylethritol-phosphate-pathway/5_4.6.1.12_RXN0-302	+
00160	–	NXP-transitions_2.7.4.3_RXN-14074	–
		NXP-transitions_2.7.4.3_BS358186	–
		NXP-transitions_2.7.4.3_CDPKIN-RXN	–
		NXP-transitions_2.7.4.3_ADENYL-KIN-RXN	–
		NXP-transitions_2.7.4.3_DEOXYADENYLATE-KINASE-RXN	–
		NXP-transitions_2.7.4.25_2.7.4.3_RXN-11832	–
00234	+	UDP-N-acetyl-D-glucosamine-biosyn-I/2_5.4.2.10_5.4.2.10-RXN	+
00239	+	peptidoglycan-biosyn-I/1_2.5.1.7_UDPACETYLGLUCOSAM...	+

Tabelle A.15 – Fortsetzung

Genlocus	H	Reaktion in <i>i</i> HD992	E
00244	–	fatty-acid-I/3a_manual_HD-acet	+
		fatty-acid-I/3a_manual_HD-prop	–
		fatty-acid-I/3a_manual_HD-buta	–
		fatty-acid-I/3a_manual_HD-ibut	–
		fatty-acid-I/3a_manual_HD-vale	–
		fatty-acid-I/3a_manual_HD-ival	–
		fatty-acid-I/3a_manual_HD-aval	–
		fatty-acid-I/3a_manual_HD-icap	–
		fatty-acid-I/3a_manual_HD-hexa	–
00247	–	S-adenosyl-L-methionine-cycle-I/4_2.5.1.6_S-ADENMETSYN...	+
00320	–	guanosine-ribonucleotides-de-novo-biosyn/2_6.3.5.2_GMP-SYN...	–
		glutamate_3.5.1.2_6.3.5.2_6.3.5.5_6.3.5.4_GLUTAMIN-RXN	–
00366	+	nicht im Modell	–
00670	–	CMP-salvage/2a_2.7.1.48_CYTIKIN-RXN	+
		UMP-salvage/2a_2.7.1.48_URIDINEKIN-RXN	–
		tRNA-charging_6.1.1.3_THREONINE-TRNA-LIGASE-RXN	+
00838	–	Wood-Ljungdahl/4_manual_1.5.-_HD-MetFV	–
00913	+	NAD-biosyn-I/5_6.3.1.5_NAD-SYNTH-NH3-RXN	+
00919	–	acetyl-CoA-to-butyrate-II/3_4.2.1.150_RXN-11667	–
		pentanoate-ferm/3_manual_4.2.1.150_HD-4.2.1.150-pent	–
		hexanoate-ferm/3_manual_4.2.1.150_HD-4.2.1.150-hex	–
		propanoate-ferm/2a_4.2.1.54_RXN-781	–
		propanoate-ferm/2b_4.2.1.54_LACTOYL-COA-DEHYDRAT...	–
01130	–	serine-degr-B/1a_2.6.1.51_SERINE-PYRUVATE-AMINOTR...	–
01131	–	serine-degr-B/2a_1.1.1.81_1.1.1.60_GLYCERATE-DEHYDRO...	–
		serine-degr-B/2b_1.1.1.81_RXN0-300	–
01169	–	~metabolism-of-biosynthesis_5.1.3.14_UDPGLCNACEPIM-RXN	–
01189	–	NADP-biosyn_2.7.1.23_NAD-KIN-RXN	+
01276	–	coenzyme-A-biosyn/4_2.7.1.24_DEPHOSPHOCOAKIN-RXN	+
001323	+	ferm-acetate/3_2.7.2.1_moddir_ACETATEKIN-RXN	–
		ferm-propanoate/3_2.7.2.1_moddir_PROPKIN-RXN	–
01327	–	fatty-acid-I/4_manual_2.3.1.n2_HD-2.3.1.n2	+
01328	–	siehe 00244	±
01330	–	fatty-acid-I/2_2.3.1.39_MALONYL-COA-ACP-TRANSA...	+
01333	–	siehe 00244	±
01354	–	farnesyl-PP-biosyn/1_2.5.1.1_GPPSYN-RXN	+
		farnesyl-PP-biosyn/2a_2.5.1.10_FPPSYN-RXN	–
		farnesyl-PP-biosyn/2b_2.5.1.10_BS421953	–

Tabelle A.15 – Fortsetzung

Genlocus	H	Reaktion in <i>i</i> HD992	E
01356	+	methylethritol-phosphate-pathway/1_2.2.1.7_DXS-RXN	–
01374	–	{ CMP-salvage/2c_2.4.2.2_BS355365	–
		{ UMP-salvage/2b_2.4.2.2_URPHOS-RXN	–
		{ dUMP-salvage/2_2.4.2.1_2.4.2.2_URA-PHOSPH-RXN	–
		{ dTMP-salvage/2_2.4.2.2_THYM-PHOSPH-RXN	–
01471	–	{ flavin-biosyn-I/8_2.7.1.26_RIBOFLAVINKIN-RXN	–
		{ flavin-biosyn-I/9_2.7.7.2_FADSYN-RXN	+
01483	–	cardiolipin-biosyn-I/1_2.7.8.5_PHOSPHAGLYPSYN-RXN	+
01569	+	D-alanyl-D-alanine/2_6.3.2.4_DALADALALIG-RXN	+
02016	–	{ NXP-transitions_2.7.4.25_2.7.4.3_RXN-11832	–
		{ NXP-transitions_2.7.4.22_2.7.4.9_2.7.4.25_RXN-14122	–
		{ NXP-transitions_2.7.4.25_RXN-7913	–
02018	+	{ methylethritol-phosphate-pathway/7a_1.17.7.4_ISPH2-RXN	–
		{ methylethritol-phosphate-pathway/7b_1.17.7.4_RXN0-884	–
02140	–	fatty-acid-I/1_6.4.1.2_ACETYL-COA-CARBOXYLTRANSF...	+
02141	–	siehe 02140	+
02142	–	biotin-carboxyl-carrier-protein-assembly/3_6.3.4.14_BIOTIN-C...	+
02143	–	biotin-carboxyl-carrier-protein-assembly/1_6.3.4.15_BIOTINLI...	+
02171	–	{ taurochenodeoxycholate-degr/1_2.3.1.65_RXN-9852	–
		{ taurochenodeoxycholate-degr/2_3.1.2.2_RXN-14289	–
		{ taurocholate-degr/1_moddir_2.3.1.65_RXN-9800	–
		{ taurocholate-degr/2_manual_3.1.2.2_HD-3.1.2.2	–
02359	+	methylethritol-phosphate-pathway/6_1.17.7.1_RXN0-882	+
02361	+	methylethritol-phosphate-pathway/2_1.1.1.267_DXPREDIS...	+
02365	–	CDP-diacylglycerol-biosyn-I/4_2.7.7.41_CDPDIGLYSYN-RXN	+
02491	+	nicht im Modell	–
02574	–	guanosine-ribonucleotides-de-novo-biosyn/1_1.1.1.205_IMP-DEH...	–
02582	+	succinate-to-butyrate/1_2.8.3.18_RXN-8807	–
02683	–	~no-pathway_2.7.1.66_UNDECAPRENOL-KINASE-RXN	–
02776	–	{ NAD-biosyn-I/4_2.7.7.18_NICONUCADENYLYLTRAN-RXN	+
		{ nicotine-transitions-C/5_2.7.7.18_2.7.7.1-RXN	–
02793	–	nicht im Modell	–
02801	+	nicht im Modell	–
02809	–	coenzyme-A-biosyn/3_2.7.7.3_PANTEPADENYLYLTRAN-RXN	+
02840	–	{ coenzyme-A-biosyn/2_4.1.1.36_P-PANTOCYSDECARB-RXN	+
		{ coenzyme-A-biosyn/1_6.3.2.5_P-PANTOCYSLIG-RXN	+
02842	–	{ NXP-transitions_2.7.4.8_GUANYL-KIN-RXN	+
		{ NXP-transitions_2.7.4.8_GMKALT-RXN	–

Tabelle A.15 – Fortsetzung

Genlocus	H	Reaktion in <i>i</i> HD992	E
02844	+	lysine-biosyn-II/8_5.1.1.7_DIAMINOPIMEPIM-RXN	+
02905	+	peptidoglycan-biosyn-I/8_2.4.1.227_NACGLCTTRANS-RXN	+
02907	+	peptidoglycan-biosyn-I/4_6.3.2.9_UDP-NACMURALA-GLU-L...	+
02909	+	peptidoglycan-biosyn-I/6_6.3.2.10_UDP-NACMURALGLDAPA...	+
02918	+	peptidoglycan-biosyn-I/5_6.3.2.13_UDP-NACMURALGLDAPL...	+
02950	–	aspartate_6.3.1.1_6.3.5.4_ASNSYNA-RXN	–
03237	–	V-type-ATPase_transport_3.6.3.15_mod_3.6.3.15-RXN	–
03238	–		
03239	–		
03240	–		
03241	–		
03242	–		
03243	–		
03465	–	glycolysis-I/5_2.7.2.3_PHOSGLYPHOS-RXN	–
03520	+	lysine-biosyn-II/2_1.2.1.11_ASPARTATE-SEMIALDEHYDE-D...	+
03523	+	lysine-biosyn-II/5_2.3.1.89_2.3.1.89-RXN	–
03699	–	glycolysis-I/8_2.7.1.40_PEPDEPHOS-RXN	–
03707	+	peptidoglycan-biosyn-I/2_1.3.1.98_UDP-NACETYLMURAMAT...	+
03777	–	~no-pathway_2.7.8.7_HOLO-ACP-SYNTH-RXN	–
03828	–	PRPP-biosynthesis-I_2.7.6.1_PRPPSYN-RXN	+
03829	–	UDP-N-acetyl-D-glucosamine-biosyn-I/3_2.3.1.157_2.3.1.157-RXN	+
		UDP-N-acetyl-D-glucosamine-biosyn-I/4_2.7.7.23_NAG1P-URID...	+
03832	+	peptidoglycan-biosyn-I/3_6.3.2.8_UDP-NACMUR-ALA-LIG-RXN	+
03858	–	adenosylcobalamin-biosynthesis-I/pp6_6.3.4.21_NICOTINATEP...	–
03865	–	NXP-transitions_2.7.4.9_DTMPKI-RXN	–
		NXP-transitions_2.7.4.9_RXN-17141	–
03875	–	~no-pathway_2.7.1.33_PANTETHEINE-KINASE-RXN	–
		~no-pathway_2.7.1.33_R04391	–
		phosphopantothenate-biosyn-I/4_2.7.1.33_PANTOTHENATE...	+
03886	+	methylethritol-phosphate-pathway/4_2.7.1.148_2.7.1...	+
03918	–	S-adenosyl-L-methionine-cycle-I/3_2.1.1.13_HOMOCYSMET...	–

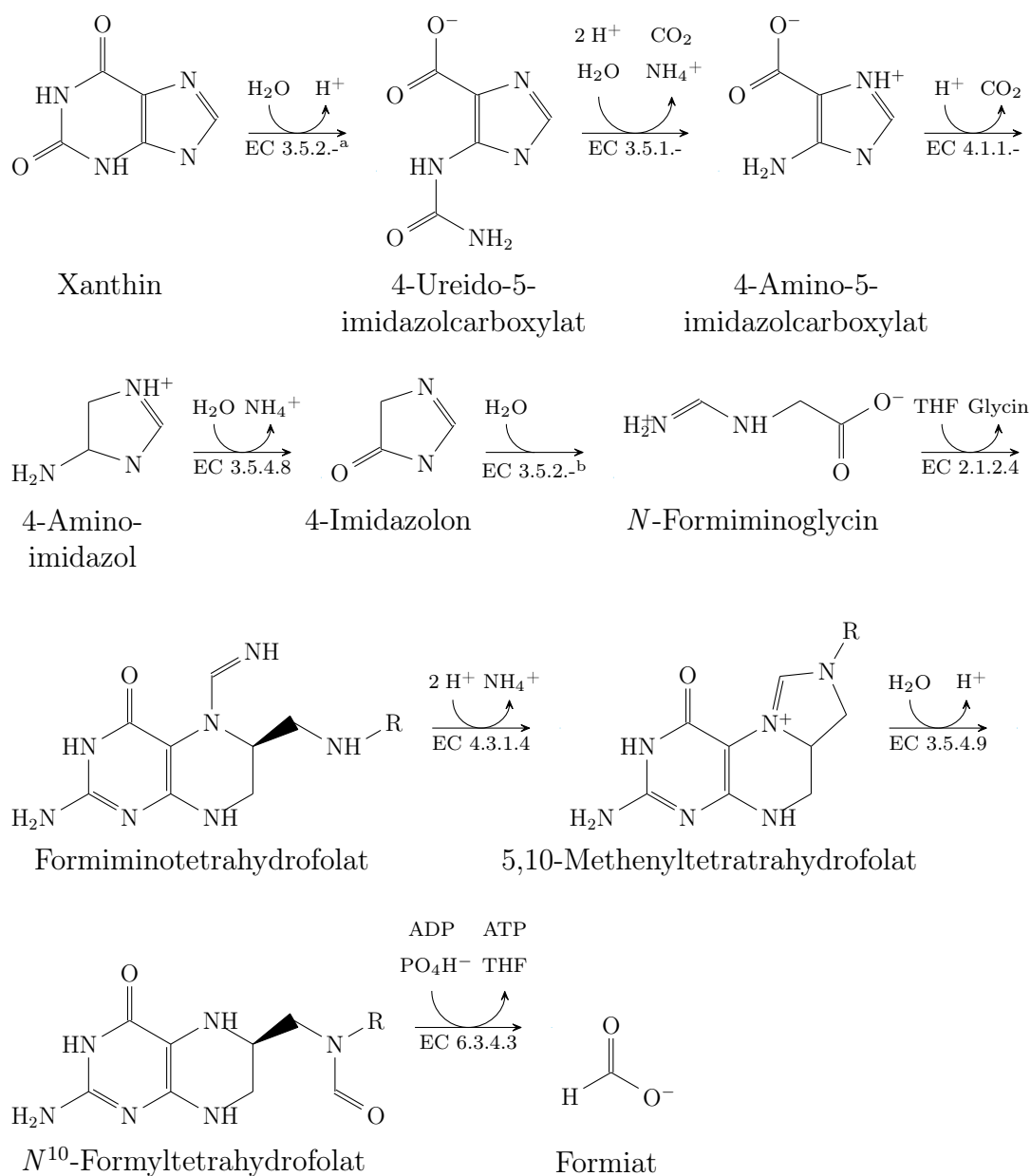


**Tabelle A.16: Ursprung der Kohlenstoffs im Zentralmetabolismus.** Isotopenmarkierungen der Metabolite der Glycolyse und benachbarter Stoffwechselwege bei einer OD<sub>600</sub> von 0,220 in MDM. Die Kultivierung wurde von Meina Neumann-Schaal mit vollständig <sup>13</sup>C-markierter Glucose durchgeführt und intrazelluläre Metabolite durch sie mittels GC/MS analysiert. Teilweise markierte Metabolite wurden nicht gefunden. G6P: Glucose-6-phosphat; 3PG: 3-Phosphoglycerat.

Metabolit	Derivat	Masse	C/Si	Backbone	Unmarkiert	Vollständig markiert
Glucose	MeOX/5TMS	319	C <sub>13</sub> Si <sub>3</sub>	C2-C5	0,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
		205	C <sub>8</sub> Si <sub>2</sub>	C5-C6	0,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
		364	C <sub>14</sub> Si <sub>3</sub>	C1-C4	0,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
G6P	MeOX/6TMS	387	C <sub>13</sub> Si <sub>3</sub>	C3-C6	36,9 ± 2,2	63,1 ± 4,9
		471	C <sub>16</sub> Si <sub>4</sub>	C2-C6	36,8 ± 3,6	62,8 ± 3,1
		160	C <sub>6</sub> Si	C1-C2	35,9 ± 3,7	64,1 ± 2,0
3PG	4TMS	387	C <sub>12</sub> Si <sub>3</sub>	C1-C3	89,5 ± 7,5	10,5 ± 1,5
		459	C <sub>14</sub> Si <sub>4</sub>	C1-C3	90,2 ± 0,3	9,8 ± 0,2
Pyruvat	2TMS	217	C <sub>8</sub> Si <sub>2</sub>	C1-C3	91,4 ± 3,3	8,6 ± 1,3
	MeOX/1TMS	174	C <sub>6</sub> Si	C1-C3	91,0 ± 3,0	9,0 ± 0,6
		189	C <sub>7</sub> Si	C1-C3	90,9 ± 3,4	9,1 ± 0,4
Alanin	2TMS	116	C <sub>5</sub> Si	C2-C3	90,1 ± 2,2	9,9 ± 0,3
		190	C <sub>7</sub> Si <sub>2</sub>	2xC	90,1 ± 0,1	8,9 ± 0,0
Lactat	2TMS	219	C <sub>8</sub> Si <sub>2</sub>	C1-C3	91,2 ± 6,3	8,8 ± 1,5
		117	C <sub>5</sub> Si	C2-C3	93,0 ± 1,9	7,0 ± 1,1
Cystein	3TMS	232	C <sub>9</sub> Si <sub>2</sub>	C1-C3	100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

**Tabelle A.17: Vorgeschlagene Proteine zur Synthese der Exopolysaccharide.** Verglichen werden *C. difficile* 630Δ*erm* und *C. acetobutylicum* ATCC 824. Die Genloci sind ohne ohne Präfix (*C. difficile*: CDIF630erm\_; *C. acetobutylicum*: CA\_C) angegeben.

<i>C. difficile</i>		Alignment		<i>C. acetobutylicum</i>	
Genlocus	Länge [bp]	Länge [bp]	Identität [%]	Genlocus	Länge [bp]
02794	414	377	51	1565	416
02795	472	473	61	1564	473
02796	371	347	27	1562	363
02797	768	750	53	1561	769
02798	340	59	46	1563	67
		337	29	0826	370



**Abbildung A.1: Abbauweg von Xanthin in *G. acidurici* und *C. cylindrosporum* [16–24].** EC 3.5.2.-<sup>a</sup>: Xanthin-Amidohydrolase; EC 3.5.1.-: 4-Ureido-5-imidazolcarboxylat-Amidohydrolase; EC 4.1.1.-: 4-Aminoimidazolcarboxylat-Decarboxylase; EC 3.5.4.8: 4-Aminoimidazol-Deaminase; EC 3.5.2.-<sup>b</sup>: 4-Imidazolnase; EC 2.1.2.4: Glycin-Formimidoyl-Transferase; EC 4.3.1.4: Formiminotetrahydrofofolat-Cylodeaminase; EC 3.5.4.9: Methenyltetrahydrofolat-Cyclohydrolase; EC 6.3.4.3: Format-Tetrahydrofolat-Ligase; THF: Tetrahydrofolat.

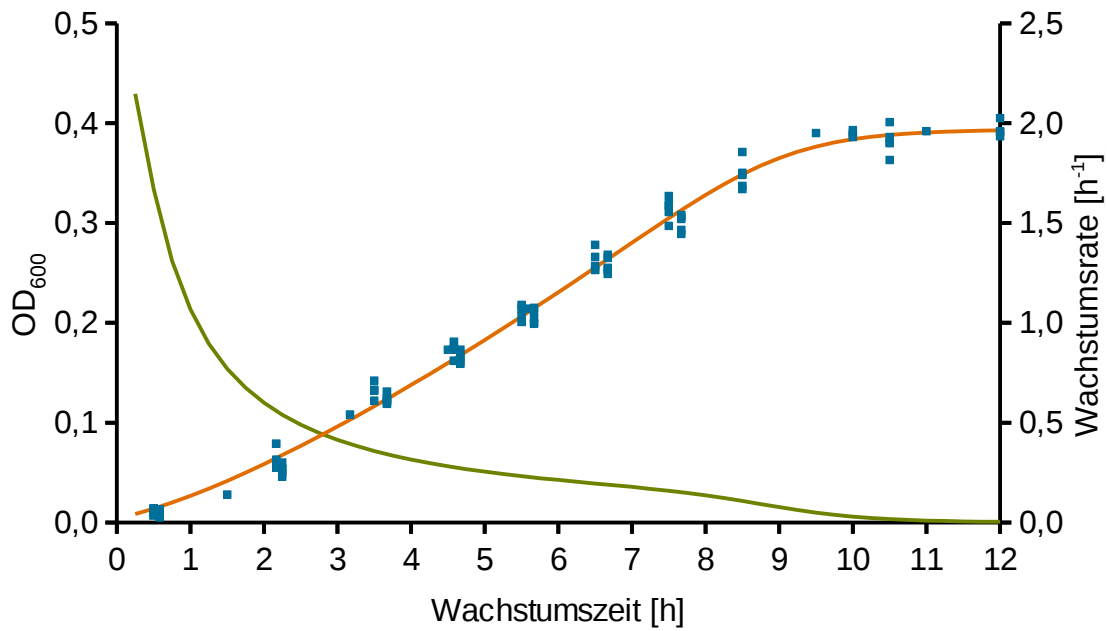


Abbildung A.2: OD<sub>600</sub> und Wachstumsrate von *C. difficile* 630 $\Delta$ erm in MDM. Blau: experimentelle ermittelte OD<sub>600</sub> [11]; rot: Funktion um OD<sub>600</sub> (siehe Tabelle A.10); grün: aus der OD<sub>600</sub> berechnete Wachstumsrate.

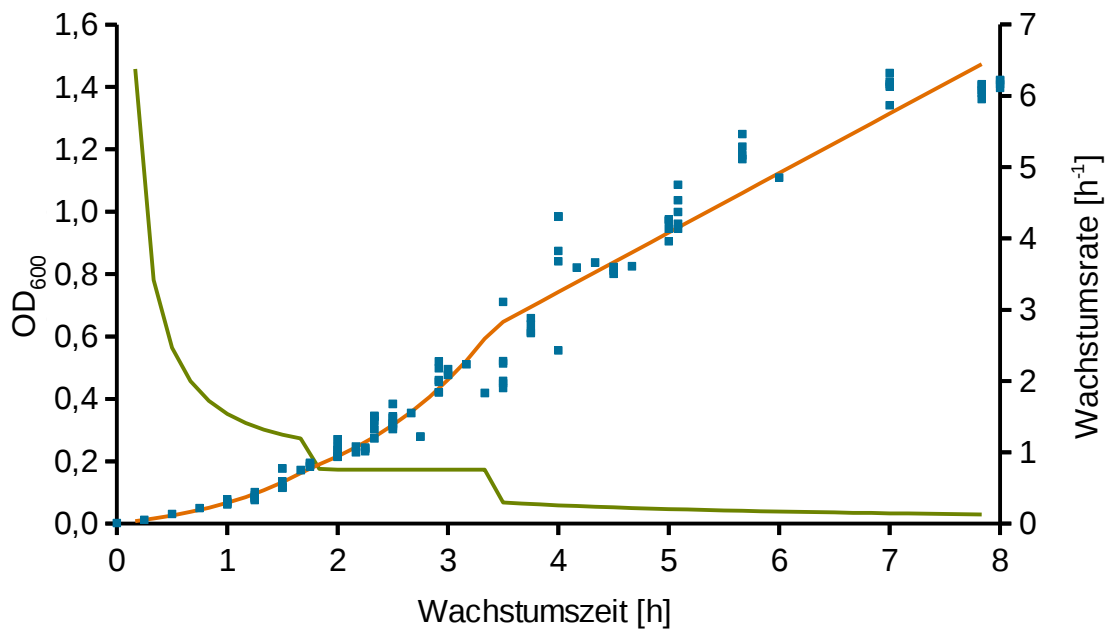


Abbildung A.3: OD<sub>600</sub> und Wachstumsrate von *C. difficile* 630 $\Delta$ erm in CDMM. Blau: experimentelle ermittelte OD<sub>600</sub> [11]; rot: Funktion um OD<sub>600</sub> (siehe Tabelle A.11); grün: aus der OD<sub>600</sub> berechnete Wachstumsrate.

Modell *i*HD992

```
##### Biomass #####
Protein_via_tRNA : 0.59772 |Charged-GLY-tRNAs| + 0.63120 |Charged-ALA-tRNAs| + 0.44284 |Charged-VAL-tRNAs|
+ 0.62167 |Charged-LEU-tRNAs| + 0.37755 |Charged-ILE-tRNAs| + 0.43067 |Charged-SER-tRNAs| + 0.44035
|Charged-THR-tRNAs| + 0.26329 |Charged-PHE-tRNAs| + 0.21261 |Charged-TYR-tRNAs| + 0.06332 |Charged-TRP-tRNAs|
+ 0.09966 |Charged-CYS-tRNAs| + 0.07019 |Charged-MET-tRNAs| + 0.65890 |Charged-LYS-tRNAs| + 0.27429
|Charged-ARG-tRNAs| + 0.10099 |Charged-HIS-tRNAs| + 0.47959 |Charged-ASP-tRNAs| + 0.88041 |Charged-GLT-tRNAs|
+ 0.47953 |Charged-ASN-tRNAs| + 0.29371 |Charged-GLN-tRNAs| + 0.36118 |Charged-PRO-tRNAs| + 0.00094
|Charged-SEC-tRNAs| -> 1.0 Protein + 0.59772 |GLY-tRNAs| + 0.63120 |ALA-tRNAs| + 0.44284 |VAL-tRNAs| + 0.62167
|LEU-tRNAs| + 0.37755 |ILE-tRNAs| + 0.43067 |SER-tRNAs| + 0.44035 |THR-tRNAs| + 0.26329 |PHE-tRNAs| + 0.21261
|TYR-tRNAs| + 0.06332 |TRP-tRNAs| + 0.09966 |CYS-tRNAs| + 0.07019 |MET-tRNAs| + 0.65890 |LYS-tRNAs| + 0.27429
|ARG-tRNAs| + 0.10099 |HIS-tRNAs| + 0.47959 |ASP-tRNAs| + 0.88041 |GLT-tRNAs| + 0.47953 |ASN-tRNAs| + 0.29371
|GLN-tRNAs| + 0.36118 |PRO-tRNAs| + 0.00094 |SEC-tRNAs| + 15.56122 H+
RNA-Biosyn : 0.83394 ATP + 0.69615 UTP + 0.66708 GTP + 0.90005 CTP + 0.02785 S-adenosyl-L-methionine + 0.00657
NADPH -> 0.02128 H+ + 3.09722 diphosphate + 1.0 RNA + 0.02785 S-adenosyl-L-homocysteine + 0.00657 NADP+
DNA-Biosyn : 1.15183 dATP + 1.15183 dTTP + 0.47233 dGTP + 0.47233 dCTP + 0.00303 S-adenosyl-L-methionine ->
0.00303 H+ + 1.0 DNA + 0.00303 S-adenosyl-L-homocysteine + 3.24832 diphosphate
Lipid-Biosyn : 0.69236 Phosphatidylglycerol + 0.36976 a_cardiolipin -> 1.0 Lipid
L-CWG-Biosyn : 2.59231 UDP-N-acetyl-alpha-D-glucosamine + 1.29615 2-phospho-D-glycerate + 0.76635
UDP-alpha-D-glucose + 0.25545 |diacyl-3-Glc-16-Glc-16-Glc-glycerol| + 1.29615 ATP + 0.05676 H2O -> 1.0 L-CWG +
3.35866 UDP + 0.31221 acetate + 1.295615 ADP + 1.29615 phosphate + 3.67087 H+
Peptidoglycan-Biosyn : 1.17591 a_peptidoglycan -> 1.0 Peptidoglycan
P-CWG-Biosyn : 1.76376 UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine + 0.88188 GDP-alpha-D-mannose + 2.64564
UDP-alpha-D-glucose -> 1.0 P-CWG + 0.88188 GMP + 4.40940 UDP + 5.29128 H+
Glycogen-Biosyn : 6.16732 |Glycogens| -> 1.0 Glycogen
Ion-Biosyn : 20.96743 K+ + 1.87732 Mg2+ + 0.14628 Fe3+ + 0.09752 Ca2+ + 1.04837 phosphate + 0.12190 diphosphate +
0.02438 Na+ + 0.02438 Fe2+ + 0.02438 Ni2+ + 0.02438 Cd2+ + 0.02438 Zn2+ -> 1.0 Ion
Metabolite-Biosyn : 0.33818 ATP + 0.08481 ADP + 0.03094 AMP + 0.17332 acetyl-CoA + 0.06667 FAD + 0.16617 NAD+
+ 0.03514 NADH + 0.00043 NADP+ + 0.02501 NADPH + 0.06667 ppGpp + 0.06667 tetrahydropteroyl_tri-L-glutamate +
0.06667 di-trans,octa-cis-undecaprenyl_diphosphate + 0.06667 thiamine_diphosphate + 0.06667 adenosylcobalamin
+ 0.06667 Mg-protoporphyrin + 0.06667 MoO2-molybdopterin_cofactor + 0.06667 |Carboxybiotin-BCCP| + 0.06667
Me-Thr-P-GluNAc-FluC + 0.06667 pyridoxine_5'-phosphate + 0.06667 L-threonylcarbamoyladenylate -> 1.0 Metabolites +
0.13334 |BCCP-monomers|
Protease : 1.0 Protein + 7.78061 H2O -> 0.59772 glycine + 0.63120 L-alanine + 0.44284 L-valine + 0.62167 L-leucine
+ 0.37755 L-isoleucine + 0.43067 L-serine + 0.44035 L-threonine + 0.26329 L-phenylalanine + 0.21261 L-tyrosine +
0.06332 L-tryptophan + 0.09966 L-cysteine + 0.07019 L-methionine + 0.65890 L-lysine + 0.27429 L-arginine + 0.10099
L-histidine + 0.47959 L-aspartate + 0.88041 L-glutamate + 0.47953 L-asparagine + 0.29371 L-glutamine + 0.36118
L-proline + 0.0094 L-selenocysteine
RNAase : 1.0 RNA + 0.02858 S-adenosyl-L-homocysteine + 0.00695 NAD+ + 3.13828 H2O -> 0.83394 AMP + 0.69615 UMP +
0.66708 GMP + 0.90005 CMP + 0.02858 S-adenosyl-L-methionine + 0.00695 NADH + 3.11665 H+
DNAase : 1.0 DNA + 0.00303 S-adenosyl-L-homocysteine + 3.24832 H2O -> 1.15220 dTMP + 0.47195 dGMP +
0.47195 dCMP + 0.00303 S-adenosyl-L-methionine + 3.24529 H+
Biomass : 0.508 Protein + 0.091 RNA + 0.043 DNA + 0.060 Lipid + 0.024 L-CWG + 0.145 Peptidoglycan + 0.097 P-CWG +
0.005 Glycogen + 0.022 Ion + 0.005 Metabolites + 45 ATP + 45 H2O -> 45 ADP + 45 phosphate + 45 H+
NGAM : 1.0 H2O + 1.0 ATP -> 1.0 ADP + 1.0 phosphate + 1.0 H+
##### EXCHANGE #####
H+_exchange : 1.0 H+[ex] <=>
H2O_exchange : 1.0 H2O[ex] <=>
H2_exchange : 1.0 H2[ex] <=>
H2S_exchange : 1.0 hydrogen_sulfide[ex] <=>
CO2_exchange : 1.0 CO2[ex] <=>
CO_exchange : 1.0 carbon_monoxide[ex] <=>
ammonium_exchange : 1.0 ammonium[ex] <=>
sulfite_exchange : 1.0 sulfite[ex] <=>
phosphate_exchange : 1.0 phosphate[ex] <=>
selenide_exchange : 1.0 selenide[ex] <=>
Co2+_exchange : 1.0 Co2+[ex] <=>
Na+_exchange : 1.0 Na+[ex] <=>
K+_exchange : 1.0 K+[ex] <=>
Mg2+_exchange : 1.0 Mg2+[ex] <=>
Fe2+_exchange : 1.0 Fe2+[ex] <=>
Fe3+_exchange : 1.0 Fe3+[ex] <=>
Ca2+_exchange : 1.0 Ca2+[ex] <=>
Ni2+_exchange : 1.0 Ni2+[ex] <=>
Cd2+_exchange : 1.0 Cd2+[ex] <=>
Zn2+_exchange : 1.0 Zn2+[ex] <=>
molybdate_exchange : 1.0 molybdate[ex] <=>
D-Glucose_exchange : 1.0 D-glucose[ex] <=>
```

```
urea_exchange : 1.0 urea[ex] <=>
methanethiol_exchange : 1.0 methanethiol[ex] <=>
ethanol_exchange : 1.0 ethanol[ex] <=>
propanol_exchange : 1.0 n-propanol[ex] <=>
butanol_exchange : 1.0 n-butanol[ex] <=>
isobutanol_exchange : 1.0 isobutanol[ex] <=>
4-methylphenol_exchange : 1.0 4-methylphenol[ex] <=>
acetone_exchange : 1.0 acetone[ex] <=>
(R)-pantothenate_exchange : 1.0 (R)-pantothenate[ex] <=>
biotin_exchange : 1.0 biotin[ex] <=>
pyridoxine_exchange : 1.0 pyridoxine[ex] <=>
2-aminobutanoate_exchange : 1.0 (S)-2-aminobutanoate[ex] <=>
S-methyl-5-thio-D-ribose_exchange : 1.0 S-methyl-5-thio-D-ribose[ex] <=>
5-aminopentanoate_exchange : 1.0 5-aminopentanoate[ex] <=>
THMF_exchange : 1.0 (2R,4S)-2-methyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran[ex] <=>
5-deoxy-D-ribose_exchange : 1.0 5-deoxy-D-ribose[ex] <=>
beta-alanine_exchange : 1.0 beta-alanine[ex] <=>
3-amino-2-methylpropanoate_exchange : 1.0 (R)-3-amino-2-methylpropanoate[ex] <=>
aminoacetone_exchange : 1.0 aminoacetone[ex] <=>
glycolaldehyde_exchange : 1.0 glycolaldehyde[ex] <=>
S-methyl-5-thio-alpha-D-ribose_1-phosphate_exchange : 1.0 S-methyl-5-thio-alpha-D-ribose_1-phosphate[ex] <=>
valine_exchange : 1.0 L-valine[ex] <=>
leucine_exchange : 1.0 L-leucine[ex] <=>
isoleucine_exchange : 1.0 L-isoleucine[ex] <=>
tryptophan_exchange : 1.0 L-tryptophan[ex] <=>
cysteine_exchange : 1.0 L-cysteine[ex] <=>
methionine_exchange : 1.0 L-methionine[ex] <=>
proline_exchange : 1.0 L-proline[ex] <=>
glycine_exchange : 1.0 glycine[ex] <=>
alanine_exchange : 1.0 L-alanine[ex] <=>
aspartate_exchange : 1.0 L-aspartate[ex] <=>
glutamate_exchange : 1.0 L-glutamate[ex] <=>
serine_exchange : 1.0 L-serine[ex] <=>
threonine_exchange : 1.0 L-threonine[ex] <=>
tyrosine_exchange : 1.0 L-tyrosine[ex] <=>
phenylalanine_exchange : 1.0 L-phenylalanine[ex] <=>
arginine_exchange : 1.0 L-arginine[ex] <=>
histidine_exchange : 1.0 L-histidine[ex] <=>
lysine_exchange : 1.0 L-lysine[ex] <=>
formate_exchange : 1.0 formate[ex] <=>
acetate_exchange : 1.0 acetate[ex] <=>
propanoate_exchange : 1.0 propanoate[ex] <=>
butanoate_exchange : 1.0 butanoate[ex] <=>
valerate_exchange : 1.0 pentanoate[ex] <=>
hexanoate_exchange : 1.0 hexanoate[ex] <=>
(S)-lactate_exchange : 1.0 (S)-lactate[ex] <=>
(R)-lactate_exchange : 1.0 (R)-lactate[ex] <=>
isocaproate_exchange : 1.0 isocaproate[ex] <=>
(R)-3-hydroxybutanoate_exchange : 1.0 (R)-3-hydroxybutanoate[ex] <=>
indole-3-acetate_exchange : 1.0 indole-3-acetate[ex] <=>
4-hydroxyphenylacetate_exchange : 1.0 4-hydroxyphenylacetate[ex] <=>
phenylacetate_exchange : 1.0 phenylacetate[ex] <=>
4-imidazoleacetate_exchange : 1.0 4-imidazoleacetate[ex] <=>
3-phenylpropanoate_exchange : 1.0 3-phenylpropanoate[ex] <=>
3-(4-hydroxyphenyl)propanoate_exchange : 1.0 3-(4-hydroxyphenyl)propanoate[ex] <=>
isobutyrate_exchange : 1.0 isobutyrate[ex] <=>
isovalerate_exchange : 1.0 isovalerate[ex] <=>
2-methylbutanoate_exchange : 1.0 2-methylbutanoate[ex] <=>
##### TRANSPORT #####
# Diffusion
H2O_transport : 1.0 H2O <=> 1.0 H2O[ex]
H2_transport : 1.0 H2 <=> 1.0 H2[ex]
CO2_transport : 1.0 CO2 <=> 1.0 CO2[ex]
CO_transport : 1.0 carbon_monoxide <=> 1.0 carbon_monoxide[ex]
H2S_transport : 1.0 hydrogen_sulfide <=> hydrogen_sulfide[ex]
methanethiol_transport : 1.0 methanethiol <=> 1.0 methanethiol[ex]
# No ammonium transporter (amtB/nrgA)
# Ammonium can diffuse with the gradient across the membrane (Kleiner 1985)
# Usually no import necessary due to amino acid degradation
```

```

spontaneous_no-pathway_RXN-11811 : 1.0 ammonia + 1.0 H+ <=> 1.0 ammonium
ammonia_transport : 1.0 ammonia <=> 1.0 ammonia[ex]
spontaneous_no-pathway_RXN-11811[ex] : 1.0 ammonia[ex] + 1.0 H+[ex] <=> 1.0 ammonium[ex]
# Diffusion as uncharged molecule assumed
spontaneous_sulfite_dissotiation : 1.0 sulfite + 2.0 H+ <=> 1.0 SO2 + H2O
sulfite_transport : 1.0 SO2 <=> 1.0 SO2[ex]
spontaneous_sulfite_dissotiation[ex] : 1.0 sulfite[ex] + 2.0 H+[ex] <=> 1.0 SO2[ex] + H2O[ex]
# Diffusion as uncharged molecule assumed
spontaneous_selenide_dissotiation : 1.0 hydrogen_selenide <=> 2.0 H+ + 1.0 selenide
selenide_transport : 1.0 hydrogen_selenide <=> 1.0 hydrogen_selenide[ex]
spontaneous_selenide_dissotiation[ex] : 1.0 hydrogen_selenide[ex] <=> 2.0 H+[ex] + 1.0 selenide[ex]
# products
ethanol_transport : 1.0 ethanol <=> 1.0 ethanol[ex]
propanol_transport : 1.0 n-propanol <=> 1.0 n-propanol[ex]
butanol_transport : 1.0 n-butanol <=> 1.0 n-butanol[ex]
isobutanol_transport : 1.0 isobutanol <=> 1.0 isobutanol[ex]
4-methylphenol_transport : 1.0 4-methylphenol <=> 1.0 4-methylphenol[ex]
acetone_transport : 1.0 acetone <=> 1.0 acetone[ex]
# small-quantity products/deadends
aminoacetone_transport : 1.0 aminoacetone <=> 1.0 aminoacetone[ex]
urea_transport : 1.0 urea <=> 1.0 urea[ex]
THMF_transport : 1.0 (2R,4S)-2-methyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran <=> 1.0
(2R,4S)-2-methyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran[ex]
S-methyl-5-thio-D-ribose_transport : 1.0 S-methyl-5-thio-D-ribose <=> 1.0 S-methyl-5-thio-D-ribose[ex]
S-methyl-5-thio-alpha-D-ribose_1-phosphate_transport : 1.0 S-methyl-5-thio-alpha-D-ribose_1-phosphate <=> 1.0
S-methyl-5-thio-alpha-D-ribose_1-phosphate[ex]
5-deoxy-D-ribose_transport : 1.0 5-deoxy-D-ribose <=> 1.0 5-deoxy-D-ribose[ex]
glycolaldehyde_transport : 1.0 glycolaldehyde <=> 1.0 glycolaldehyde[ex]
#####
# Weak acids
## CDIF630erm_03708,CDIF630erm_02463
formate_transport : 1.0 H+ + 1.0 formate <=> 1.0 formate[ex] + 1.0 H+[ex]
acetate_transport : 1.0 H+ + 1.0 acetate <=> 1.0 acetate[ex] + 1.0 H+[ex]
propanoate_transport : 1.0 H+ + 1.0 propanoate <=> 1.0 propanoate[ex] + 1.0 H+[ex]
n-butanoate_transport : 1.0 H+ + 1.0 butanoate <=> 1.0 butanoate[ex] + 1.0 H+[ex]
pentanoate_transport : 1.0 H+ + 1.0 pentanoate <=> 1.0 pentanoate[ex] + 1.0 H+[ex]
hexanoate_transport : 1.0 H+ + 1.0 hexanoate <=> 1.0 hexanoate[ex] + 1.0 H+[ex]
(R)-3-hydroxybutanoate_transport : 1.0 H+ + 1.0 (R)-3-hydroxybutanoate <=> 1.0 (R)-3-hydroxybutanoate[ex] + 1.0
H+[ex]
## CDIF630erm_00920
(S)-lactate_transport : 1.0 Na+ + 1.0 (S)-lactate <=> 1.0 (S)-lactate[ex] + 1.0 Na+[ex]
(R)-lactate_transport : 1.0 Na+ + 1.0 (R)-lactate <=> 1.0 (R)-lactate[ex] + 1.0 Na+[ex]
indole-3-acetate_transport : 1.0 H+ + 1.0 indole-3-acetate <=> 1.0 indole-3-acetate[ex] + 1.0 H+[ex]
4-hydroxyphenylacetate_transport : 1.0 H+ + 1.0 4-hydroxyphenylacetate <=> 1.0 4-hydroxyphenylacetate[ex] + 1.0
H+[ex]
phenylacetate_transport : 1.0 H+ + 1.0 phenylacetate <=> 1.0 phenylacetate[ex] + 1.0 H+[ex]
4-imidazoleacetate_transport : 1.0 H+ + 1.0 4-imidazoleacetate <=> 1.0 4-imidazoleacetate[ex] + 1.0 H+[ex]
3-phenylpropanoate_transport : 1.0 H+ + 1.0 3-phenylpropanoate <=> 3-phenylpropanoate[ex] + 1.0 H+[ex]
3-(4-hydroxyphenyl)propanoate_transport : 1.0 H+ + 1.0 3-(4-hydroxyphenyl)propanoate <=>
3-(4-hydroxyphenyl)propanoate[ex] + 1.0 H+[ex]
isobutyrate_transport : 1.0 H+ + 1.0 isobutyrate <=> 1.0 isobutyrate[ex] + 1.0 H+[ex]
isovalerate_transport : 1.0 H+ + 1.0 isovalerate <=> 1.0 isovalerate[ex] + 1.0 H+[ex]
2-methylbutanoate_transport : 1.0 H+ + 1.0 2-methylbutanoate <=> 1.0 2-methylbutanoate[ex] + 1.0 H+[ex]
isocaproate_transport : 1.0 H+ + 1.0 isocaproate <=> 1.0 isocaproate[ex] + 1.0 H+[ex]
#####
# Amino acids
## CDIF630erm_02711; CDIF630erm_01724
threonine_antiport : 1.0 L-serine[ex] + 1.0 L-threonine <=> 1.0 L-serine + 1.0 L-threonine[ex]
## CDIF630erm_02948
serine_transport : 1.0 Na+ + 1.0 L-serine <=> 1.0 Na+[ex] + 1.0 L-serine[ex]
threonine_transport : 1.0 Na+ + 1.0 L-threonine <=> 1.0 Na+[ex] + 1.0 L-threonine[ex]
## CDIF630erm_02511, CDIF630erm_02664
alanine_transport : 1.0 Na+ + 1.0 L-alanine <=> 1.0 Na+[ex] + 1.0 L-alanine[ex]
# glycine similar to alanine
glycine_transport : 1.0 Na+ + 1.0 glycine <=> 1.0 Na+[ex] + 1.0 glycine[ex]
## CDIF630erm_02521, CDIF630erm_02522; CDIF630erm_02958; CDIF630erm_01412; CDIF630erm_01413; CDIF630erm_00949
valine_transport : 1.0 Na+ + 1.0 L-valine <=> 1.0 Na+[ex] + 1.0 L-valine[ex]
leucine_transport : 1.0 Na+ + 1.0 L-leucine <=> 1.0 Na+[ex] + 1.0 L-leucine[ex]
isoleucine_transport : 1.0 Na+ + 1.0 L-isoleucine <=> 1.0 Na+[ex] + 1.0 L-isoleucine[ex]

```

```

## CDIF630erm_02197
tryptophan_transport : 1.0 Na+ + 1.0 L-tryptophan <=> 1.0 Na+[ex] + 1.0 L-tryptophan[ex]
## CDIF630erm_00949? Used by the Leu-Operon; CDIF630erm_02197? Similar to trp
tyrosine_transport : 1.0 Na+ + 1.0 L-tyrosine <=> 1.0 Na+[ex] + 1.0 L-tyrosine[ex]
phenylalanine_transport : 1.0 Na+ + 1.0 L-phenylalanine <=> 1.0 Na+[ex] + 1.0 L-phenylalanine[ex]
## CDIF630erm_01940
glutamate_transport : 1.0 Na+ + 1.0 L-glutamate <=> 1.0 L-glutamate[ex] + 1.0 Na+[ex]
# Transport unknown, Na+ symport as a guess
proline_transport : 1.0 Na+ + 1.0 L-proline <=> 1.0 Na+[ex] + 1.0 L-proline[ex]
cysteine_transport : 1.0 Na+ + 1.0 L-cysteine <=> 1.0 Na+[ex] + 1.0 L-cysteine[ex]
lysine_transport : 1.0 Na+ + 1.0 L-lysine <=> 1.0 Na+[ex] + 1.0 L-lysine[ex]
5-aminopentanoate_transport : 1.0 Na+ + 1.0 5-aminopentanoate <=> 1.0 Na+[ex] + 1.0 5-aminopentanoate[ex]
2-aminobutanoate_transport : 1.0 Na+ + 1.0 (S)-2-aminobutanoate <=> 1.0 Na+[ex] + 1.0 (S)-2-aminobutanoate[ex]
beta-alanine_transport : 1.0 Na+ + 1.0 beta-alanine <=> 1.0 Na+[ex] + 1.0 beta-alanine[ex]
(R)-pantothenate_transport : 1.0 Na+ + 1.0 (R)-pantothenate <=> 1.0 Na+[ex] + 1.0 (R)-pantothenate[ex]
(R)-3-amino-2-methylpropanoate_transport : 1.0 Na+ + 1.0 (R)-3-amino-2-methylpropanoate[ex] <=> 1.0 Na+[ex] + 1.0
(R)-3-amino-2-methylpropanoate
# CDIF630erm_00868-CDIF630erm_00870
arginine_3.6.3._transport : 1.0 H2O + 1.0 ATP + 1.0 L-arginine[ex] -> 1.0 H+ + 1.0 phosphate + 1.0 ADP + 1.0
L-arginine
## CDIF630erm_01654-CDIF630erm_01656
methionine_transport : 1.0 L-methionine[ex] + 1.0 H2O + 1.0 ATP -> 1.0 ADP + 1.0 L-methionine + 1.0 phosphate +
1.0 H+
# unknown, ABC-transporter is a guess
## CDIF630erm_01972-CDIF630erm_01974?; CDIF630erm_00868-CDIF630erm_00870?
aspartate_transport : 1.0 H2O + 1.0 L-aspartate[ex] + 1.0 ATP -> 1.0 L-aspartate + 1.0 ADP + 1.0 phosphate + 1.0
H+
histidine_transport : 1.0 H2O + 1.0 ATP + 1.0 L-histidine[ex] -> 1.0 H+ + 1.0 phosphate + 1.0 ADP + 1.0
L-histidine
pyridoxine_transport : 1.0 H2O + 1.0 ATP + 1.0 pyridoxine[ex] -> 1.0 H+ + 1.0 phosphate + 1.0 ADP + 1.0 pyridoxine
# ABC-Transport
phosphate_transport : 1.0 H2O + 1.0 ATP + 1.0 phosphate[ex] -> 1.0 ADP + 2.0 phosphate + 1.0 H+
Ni2+_transport : 1.0 H2O + 1.0 ATP + 1.0 Ni2+[ex] -> 1.0 Ni2+ + 1.0 ADP + 1.0 phosphate + 1.0 H+
# CDIF630erm_00452-CDIF630erm_00455
Co2+_transport_3.6.3.2_3.6.3.5 : 1.0 H2O + 1.0 Co2+[ex] + 1.0 ATP -> 1.0 phosphate + 1.0 ADP + 1.0 Co2+ + 1.0 H+
Mg2+_transport_3.6.3.2_ : 1.0 H2O + 1.0 Mg2+[ex] + 1.0 ATP -> 1.0 Mg2+ + 1.0 phosphate + 1.0 ADP + 1.0 H+
Fe3+_transport_3.6.3.30 : 1.0 ATP + 1.0 Fe3+[ex] + 1.0 H2O -> 1.0 ADP + 1.0 Fe3+ + 1.0 phosphate + 1.0 H+
K+_transport_3.6.3.12 : 1.0 H2O + 1.0 K+[ex] + 1.0 ATP -> 1.0 K+ + 1.0 phosphate + 1.0 ADP + 1.0 H+
Ca2+_transport_3.6.3.8 : 1.0 ATP + 1.0 H2O + 1.0 Ca2+[ex] -> 1.0 phosphate + 1.0 ADP + 1.0 Ca2+ + 1.0 H+
## CDIF630erm_00989-CDIF630erm_00991
molybdate_transport_3.6.3.29 : 1.0 H2O + 1.0 ATP + 1.0 molybdate[ex] -> 1.0 phosphate + 1.0 ADP + 1.0 molybdate +
1.0 H+
## CDIF630erm_01641 - CDIF630erm_01643; CDIF630erm_01684, CDIF630erm_01685; CDIF630erm_01939; CDIF630erm_03573,
CDIF630erm_03574
Fe2+_transport : 1.0 GTP + 1.0 H2O + 1.0 Fe2+[ex] -> 1.0 phosphate + 1.0 H+ + 1.0 GDP + 1.0 Fe2+
Cd2+_transport_3.6.3.3 : 1.0 H2O + 1.0 ATP + 1.0 Cd2+[ex] <=> 1.0 Cd2+ + 1.0 ADP + 1.0 phosphate + 1.0 H+
Zn2+_transport_3.6.3.5 : 1.0 Zn2+[ex] + 1.0 ATP + 1.0 H2O -> 1.0 Zn2+ + 1.0 phosphate + 1.0 ADP + 1.0 H+
#####
# Other
## CDIF630erm_03256
biotin_transport : 1.0 biotin[ex] <=> 1.0 biotin
## CDIF630erm_02351
Mg2+_transport : 1.0 Mg2+[ex] <- 1.0 Mg2+
## CDIF630erm_01919
P04/Na_transport : 1.0 Na+[ex] + 1.0 phosphate[ex] <=> 1.0 Na+ + 1.0 phosphate
## CDIF630erm_02923; CDIF630erm_02325; CDIF630erm_03939
potassium_transport : 1.0 K+[ex] + 1.0 H+ <=> 1.0 K+ + 1.0 H+[ex]
#####
# Proton and Na+ transport
# 10 c-subunits (9-12 normal?) in E. coli [25] -> 3.3 H+/ATP
F-type-ATPase_transport_3.6.3.14_mod-ATPSYN-RXN : 1.0 H2O + 1.0 ATP + 2.66667 H+ <=> 1.0 phosphate + 1.0 ADP +
3.66667 H+[ex]
# Subunit K is highly similar to Enterococcus hirae; E. hirae has 10 K-subunits per ATPase [26] -> 3.3 Na+/ATP
V-type-ATPase_transport_3.6.3.15_mod_3.6.3.15-RXN : 1.0 H2O + 1.0 ATP + 3.66667 Na+ <=> 1.0 phosphate + 1.0 ADP +
3.66667 Na+[ex] + 1.0 H+
## CDIF630erm_01284-CDIF630erm_01289
# Proton dependence assumed because the Rnf-complex of C. ljungdahlii is proton dependent [27]
# Reversible in vitro in A. woodii [28]
rnfABCDEG_transport : 2.0 |Reduced-ferredoxins| + 1.0 NAD+ + 3.0 H+ <=> 2.0 |Oxidized-ferredoxins| + 1.0 NADH +

```

## Anhang

---

```
2.0 H+[ex]
## CDIF630erm_00770; CDIF630erm_02996; CDIF630erm_02923
sodium_transport : 1.0 Na+[ex] + 1.0 H+ <=> 1.0 Na+ + 1.0 H+[ex]
#####
# Glucose PTS-system
PTS-system_2.7.3.9_2.7.3.9-RXN : 1.0 phosphoenolpyruvate + 1.0 |PTS-I-Histidines| -> 1.0 pyruvate + 1.0
|PTS-I-pi-phospho-L-histidines|
glucose_transport_2.7.1.199 : 1.0 |PTS-I-pi-phospho-L-histidines| + 1.0 D-glucose[ex] -> 1.0 |PTS-I-Histidines| +
1.0 D-glucose_6-phosphate
##### glycolysis I: #####
glycolysis-I/1_5.3.1.9_PGLUCISOM-RXN : 1.0 D-glucose_6-phosphate <=> 1.0 beta-D-fructofuranose_6-phosphate
glycolysis-I/2b_3.1.3.11_F16BDEPHOS-RXN : 1.0 fructose_1,6-bisphosphate + 1.0 H2O -> 1.0
beta-D-fructofuranose_6-phosphate + 1.0 phosphate
glycolysis-I/2a_2.7.1.11_6PFRUCTPHOS-RXN : 1.0 beta-D-fructofuranose_6-phosphate + 1.0 ATP -> 1.0
fructose_1,6-bisphosphate + 1.0 H+ + 1.0 ADP
glycolysis-I/3_4.1.2.13_F16ALDOLASE-RXN : 1.0 fructose_1,6-bisphosphate <=> 1.0 D-glyceraldehyde_3-phosphate + 1.0
glycerone_phosphate
glycolysis-I/p4_5.3.1.1_TRIOSEPISOMERIZATION-RXN : 1.0 D-glyceraldehyde_3-phosphate <=> 1.0 glycerone_phosphate
glycolysis-I/4_1.2.1.12_GAPDHSYNEC-RXN_WOP : 1.0 D-glyceraldehyde_3-phosphate + 1.0 phosphate + 1.0 NAD+ <=> 1.0
1,3-bisphospho-D-glycerate + 1.0 NADH + 1.0 H+
glycolysis-I/5_2.7.2.3_PHOSGLYPHOS-RXN : 1.0 3-phospho-D-glycerate + 1.0 ATP <=> 1.0 ADP + 1.0
1,3-bisphospho-D-glycerate
glycolysis-I/6_5.4.2.12_3PGAREARR-RXN : 1.0 2-phospho-D-glycerate <=> 1.0 3-phospho-D-glycerate
glycolysis-I/7_4.2.1.11_2PGADEHYDRAT-RXN : 1.0 2-phospho-D-glycerate <=> 1.0 H2O + 1.0 phosphoenolpyruvate
glycolysis-I/8_2.7.1.40_PEPDEPHOS-RXN : 1.0 ATP + 1.0 pyruvate <=> 1.0 phosphoenolpyruvate + 1.0 ADP + 1.0 H+
# glycolysis IV
glycolysis-IV/2c_2.7.1.90_2.7.1.90-RXN : 1.0 diphosphate + 1.0 beta-D-fructofuranose_6-phosphate <=> 1.0
fructose_1,6-bisphosphate + 1.0 phosphate + 1.0 H+
glycolysis-IV/4b_1.2.1.9_1.2.1.9-RXN : 1.0 NADP+ + 1.0 H2O + 1.0 D-glyceraldehyde_3-phosphate -> 1.0
3-phospho-D-glycerate + 2.0 H+ + 1.0 NADPH
#
glycolysis-C/8b_2.7.9.1_PYRUVATEORTHOPHOSPHATE-DIKINASE-RXN : 1.0 phosphate + 1.0 ATP + 1.0 pyruvate -> 1.0
diphosphate + 1.0 phosphoenolpyruvate + 1.0 H+ + 1.0 AMP
##### methylglyoxal-degradation-I #####
# S-lactoyl-glutathione not found in all tested Clostridia [29] and no 6.3.2.2/3 found in C. difficile; probably
other coenzyme
methylglyoxal-degradation-I/p1_4.2.3.3_METHGLYSYN-RXN : 1.0 glycerone_phosphate -> 1.0 methylglyoxal + 1.0
phosphate
methylglyoxal-degradation-I/1_4.4.1.5_GLYOXI-RXN : 1.0 (R)-S-lactoylglutathione <=> 1.0 methylglyoxal + 1.0
glutathione
methylglyoxal-degradation-I/2_3.1.2.6_GLYOXII-RXN : 1.0 H2O + 1.0 (R)-S-lactoylglutathione -> 1.0 glutathione +
1.0 (R)-lactate + 1.0 H+
##### Wood-Ljungdahl #####
# Pathway can act in the reverse direction [30, 31]
# Reversible in C. cylindrosporum [24]
Wood-Ljungdahl/1_moddir_6.3.4.3_FORMATETHFLIG-RXN : 1.0 formate + 1.0 ATP + 1.0 tetrahydropteroyl_tri-L-glutamate
<=> 1.0 ADP + 1.0 10-formyltetrahydrofolate + 1.0 phosphate
Wood-Ljungdahl/2_moddir_3.5.4.9_METHENYLTHFCYCLOHYDRO-RXN : 1.0 5,10-methenyltetrahydrofolate + 1.0 H2O <=> 1.0 H+
+ 1.0 10-formyltetrahydrofolate
Wood-Ljungdahl/3_1.5.1.5_METHYLENETHFDEHYDROG-NADP-RXN : 1.0 5,10-methylene-tetrahydrofolate + 1.0 NADP+ <=> 1.0
5,10-methenyltetrahydrofolate + 1.0 NADPH
# Bifurcating methylene-tetrahydrofolate reductase as proposed C. ljungdahlii and C. autoethanogenum [32-34]
Wood-Ljungdahl/4_manual_1.5.-_HD-MetFV : 1.0 N5-methyl-tetrahydrofolate + 2.0 |Reduced-ferredoxins| + 2.0 NAD+ <-
1.0 5,10-methylene-tetrahydrofolate + 2.0 NADH + 2.0 |Oxidized-ferredoxins|
Wood-Ljungdahl/5_2.1.1.258_METHCOCLTH-RXN : 1.0 |Methylated-corrinoid-Fe-S-Proteins| + 1.0
tetrahydropteroyl_tri-L-glutamate <=> 1.0 H+ + 1.0 |CoI-Corrinoid-Fe-S-proteins| + 1.0 N5-methyl-tetrahydrofolate
# CDIF630erm_00832: 1.2.7.4 in Wood-Ljungdahl-Operon; production of CO with Ferredoxins used; only <- because of
CO degradation (see below)
Wood-Ljungdahl/p6_moddir_1.2.7.4_1.2.7.4-RXN : 1.0 H2O + 1.0 carbon_monoxide + 2.0 |Oxidized-ferredoxins| <- 2.0 H+
+ 1.0 CO2 + 2.0 |Reduced-ferredoxins|
Wood-Ljungdahl/6_2.3.1.169_ACETILSYNCLTH-RXN : 1.0 H+ + 1.0 acetyl-CoA + 1.0 |CoI-Corrinoid-Fe-S-proteins| <=> 1.0
|Methylated-corrinoid-Fe-S-Proteins| + 1.0 coenzyme_A + 1.0 carbon_monoxide
##### CO degradation C (CDIF630erm_00296-CDIF630erm_00298) #####
CO-degradation-C_manual_HD-CO-DEHYD : 1.0 carbon_monoxide + 1.0 H2O + 1.0 NAD+ -> 1.0 CO2 + 1.0 NADH + 1.0 H+
##### Dihydrogen #####
dihydrogen-production-A_moddir_1.12.7.2_HYDROG-RXN : 2.0 |Oxidized-ferredoxins| + 1.0 H2 <- 2.0 H+ + 2.0
|Reduced-ferredoxins|
# Homolog to the bifurcating hydrogenase of T. maritima [35]
dihydrogen-production-B_manual_1.12.1.-_HD-Bifur-Hyd : 2.0 |Oxidized-ferredoxins| + 2.0 H2 + 1.0 NADP+ <=> 3.0 H+ +
```



```
1.0 NADPH + 2.0 |Reduced-ferredoxins|
# CDIF630erm_03614-CDIF630erm_03619 [36]
dihydrogen-production-C_manual_1.1.99.33_1.12.1.3_HD-Form-Hyd : 1.0 H+ + 1.0 formate -> 1.0 CO2 + 1.0 H2
##### ppp non-ox #####
ppp-non-ox/1a_5.3.1.6_RIB5PISOM-RXN : 1.0 D-ribose_5-phosphate <=> 1.0 D-ribulose_5-phosphate
ppp-non-ox/1b_5.1.3.1_RIBULP3EPIM-RXN : 1.0 D-ribulose_5-phosphate <=> 1.0 D-xylulose_5-phosphate
ppp-non-ox/2_2.2.1.1_R06863 : 1.0 thiamine_diphosphate + 1.0 D-sedoheptulose_7-phosphate <=> 1.0
D-ribose_5-phosphate + 1.0 alpha,beta-Dihydroxyethyl-TPP
ppp-non-ox/3_2.2.1.1_R06861 : 1.0 D-xylulose_5-phosphate + 1.0 thiamine_diphosphate <=> 1.0
D-glyceraldehyde_3-phosphate + 1.0 alpha,beta-Dihydroxyethyl-TPP
ppp-non-ox/4_2.2.1.2_TRANSALDOL-RXN : 1.0 D-glyceraldehyde_3-phosphate + 1.0 D-sedoheptulose_7-phosphate <=> 1.0
beta-D-fructofuranose_6-phosphate + 1.0 D-erythrose_4-phosphate
ppp-non-ox/5_2.2.1.1_2TRANSKETO-RXN : 1.0 D-xylulose_5-phosphate + 1.0 D-erythrose_4-phosphate <=> 1.0
D-glyceraldehyde_3-phosphate + 1.0 beta-D-fructofuranose_6-phosphate
PRPP-biosynthesis-I_2.7.6.1_PRPPSYN-RXN : 1.0 D-ribose_5-phosphate + 1.0 ATP <=> 1.0 H+ + 1.0 AMP + 1.0
5-phospho-alpha-D-ribose_1-diphosphate
# side reactions
sedoheptulose-bisphosphate-bypass_2.7.1.11_RXN0-6541 : 1.0 D-sedoheptulose_7-phosphate + 1.0 ATP -> 1.0 ADP + 1.0
D-sedoheptulose-1,7-bisphosphate + 1.0 H+
sedoheptulose-bisphosphate-bypass_4.1.2.13_SEDOBISALDOL-RXN : 1.0 glycerone_phosphate + 1.0
D-erythrose_4-phosphate <=> 1.0 D-sedoheptulose-1,7-bisphosphate
Calvin-Benson-Bassham-cycle_3.1.3.11_SEDOHEPTULOSE-BISPHOSPHATASE-RXN : 1.0 H2O + 1.0
D-sedoheptulose-1,7-bisphosphate -> 1.0 D-sedoheptulose_7-phosphate + 1.0 phosphate
##### TCA #####
TCA-cycle/1_4.2.1.1_CARBODEHYDRAT-RXN : 1.0 hydrogen_carbonate <=> 1.0 CO2 + 1.0 H2O
TCA-cycle/2_6.4.1.1_PYRUVATE-CARBOXYLASE-RXN : 1.0 hydrogen_carbonate + 1.0 ATP + 1.0 pyruvate -> 1.0 phosphate +
1.0 oxaloacetate + 1.0 ADP + 1.0 H+
TCA-cycle/3_2.3.3.3_CITSYN-RXN : 1.0 H2O + 1.0 acetyl-CoA + 1.0 oxaloacetate -> 1.0 H+ + 1.0 coenzyme_A + 1.0
citrate
TCA-cycle/4_4.2.1.3_ACONITATEDEHYDR-RXN : 1.0 citrate <=> 1.0 H2O + 1.0 cis-aconitate
TCA-cycle/5_4.2.1.3_ACONITATEHYDR-RXN : 1.0 cis-aconitate + 1.0 H2O <=> 1.0 D-threo-isocitrate
TCA-cycle/6_1.1.1.41_ISOCITRATE-DEHYDROGENASE-NAD+-RXN : 1.0 D-threo-isocitrate + 1.0 NAD+ -> 1.0 NADH + 1.0
2-oxoglutarate + 1.0 CO2
TCA-cycle/7_4.2.1.2_FUMHYDR-RXN : 1.0 (S)-malate <=> 1.0 H2O + 1.0 fumarate
TCA-cycle/8_1.1.1.38_1.1.1.39-RXN : 1.0 (S)-malate + 1.0 NAD+ -> 1.0 NADH + 1.0 CO2 + 1.0 pyruvate
TCA-cycle/9_1.1.1.38_OXALODECARB-RXN : 1.0 H+ + 1.0 oxaloacetate -> 1.0 CO2 + 1.0 pyruvate
##### Fatty acids I #####
NADP-reduction_manual_HD-NfnAB : 2.0 |Reduced-ferredoxins| + 1.0 NADH + 2.0 NADP+ + 1.0 H+ <=> 2.0
|Oxidized-ferredoxins| + 1.0 NAD+ + 2.0 NADPH
fatty-acid-I/1_6.4.1.2_ACETYL-COA-CARBOXYLTRANSFER-RXN : 1.0 hydrogen_carbonate + 1.0 ATP + 1.0 acetyl-CoA -> 1.0
ADP + 1.0 H+ + 1.0 phosphate + 1.0 malonyl-CoA
fatty-acid-I/2_2.3.1.39_MALONYL-COA-ACP-TRANSACYL-RXN : 1.0 malonyl-CoA + 1.0 Acyl-carrier_protein <=> 1.0
coenzyme_A + 1.0 Malonyl-[acyl-carrier_protein]
# chain lenght: 16.246
# unsaturated: 0.164
# from C. difficile NCIB 10666 [5]
# 2.3.1.41/179/180/n2_1.1.1.100_1.3.1.9_4.2.1.59
fatty-acid-I/3a_manual_HD-acet : 1.0 acetyl_phosphate + 7.123 Malonyl-[acyl-carrier_protein] + 21.205 H+ + 14.082
NADPH -> 1.0 Acyl-[acyl-carrier_protein] + 6.123 Acyl-carrier_protein + 7.123 H2O + 7.123 CO2 + 14.082 NADP+ + 1.0
phosphate
fatty-acid-I/3b_manual_HD-prop : 1.0 propanoyl_phosphate + 6.623 Malonyl-[acyl-carrier_protein] + 19.705 H+ +
13.082 NADPH -> 1.0 Acyl-[acyl-carrier_protein] + 5.623 Acyl-carrier_protein + 6.623 H2O + 6.623 CO2 + 13.082 NADP+
+ 1.0 phosphate
fatty-acid-I/3c_manual_HD-buta : 1.0 butanoyl_phosphate + 6.123 Malonyl-[acyl-carrier_protein] + 18.205 H+ +
12.082 NADPH -> 1.0 Acyl-[acyl-carrier_protein] + 5.123 Acyl-carrier_protein + 6.123 H2O + 6.123 CO2 + 12.082 NADP+
+ 1.0 phosphate
fatty-acid-I/3d_manual_HD-ibut : 1.0 isobutyryl_phosphate + 6.123 Malonyl-[acyl-carrier_protein] + 18.205 H+ +
12.082 NADPH -> 1.0 Acyl-[acyl-carrier_protein] + 5.123 Acyl-carrier_protein + 6.123 H2O + 6.123 CO2 + 12.082 NADP+
+ 1.0 phosphate
fatty-acid-I/3e_manual_HD-vale : 1.0 pentanoyl_phosphate + 5.623 Malonyl-[acyl-carrier_protein] + 16.705 H+ +
11.082 NADPH -> 1.0 Acyl-[acyl-carrier_protein] + 4.623 Acyl-carrier_protein + 5.623 H2O + 5.623 CO2 + 11.082 NADP+
+ 1.0 phosphate
fatty-acid-I/3f_manual_HD-ival : 1.0 isovaleryl_phosphate + 5.623 Malonyl-[acyl-carrier_protein] + 16.705 H+ +
11.082 NADPH -> 1.0 Acyl-[acyl-carrier_protein] + 4.623 Acyl-carrier_protein + 5.623 H2O + 5.623 CO2 + 11.082 NADP+
+ 1.0 phosphate
fatty-acid-I/3g_manual_HD-aval : 1.0 2-methylbutanoyl_phosphate + 5.623 Malonyl-[acyl-carrier_protein] + 16.705
H+ + 11.082 NADPH -> 1.0 Acyl-[acyl-carrier_protein] + 4.623 Acyl-carrier_protein + 5.623 H2O + 5.623 CO2 + 11.082
NADP+ + 1.0 phosphate
fatty-acid-I/3h_manual_HD-icap : 1.0 isocaproyl_phosphate + 5.123 Malonyl-[acyl-carrier_protein] + 15.205 H+ +
```

```

10.082 NADPH -> 1.0 Acyl-[acyl-carrier_protein] + 4.123 Acyl-carrier_protein + 5.123 H2O + 5.123 CO2 + 10.082 NADP+
+ 1.0 phosphate
fatty-acid-I/3i_manual_HD-hexa : 1.0 hexanoyl_phosphate + 5.123 Malonyl-[acyl-carrier_protein] + 15.205 H+ +
10.082 NADPH -> 1.0 Acyl-[acyl-carrier_protein] + 4.123 Acyl-carrier_protein + 5.123 H2O + 5.123 CO2 + 10.082 NADP+
+ 1.0 phosphate
fatty-acid-I/4_manual_2.3.1.n2_HD-2.3.1.n2 : 1.0 Acyl-[acyl-carrier_protein] + 1.0 phosphate <=> 1.0
fatty_acid_phosphate + 1.0 Acyl-carrier_protein
##### CDP-diacylglycerol-biosyn-I #####
CDP-diacylglycerol-biosyn-I/1_modnames_1.1.1.94_1.1.1.261-RXN : 1.0 sn-glycerol_3-phosphate + 1.0 NADP+ <- 1.0 H+ +
1.0 glycerone_phosphate + 1.0 NADPH
CDP-diacylglycerol-biosyn-I/2_manual_2.3.1.n3_HD-2.3.1.n3 : 1.0 fatty_acid_phosphate + 1.0 sn-glycerol_3-phosphate
<=> 1.0 1-acyl-sn-glycerol_3-phosphate + 1.0 phosphate
CDP-diacylglycerol-biosyn-I/3_2.3.1.51_BS321039 : 1.0 Acyl-[acyl-carrier_protein] + 1.0
1-acyl-sn-glycerol_3-phosphate <=> 1.0 1,2-diacyl-sn-glycerol_3-phosphate + 1.0 Acyl-carrier_protein
CDP-diacylglycerol-biosyn-I/4_2.7.7.41_CDPDIGLYSYN-RXN : 1.0 1,2-diacyl-sn-glycerol_3-phosphate + 1.0 CTP + 1.0 H+
-> 1.0 diphosphate + 1.0 CDP-1,2-diacyl-sn-glycerol
##### cardiolipin biosynthesis I #####
cardiolipin-biosyn-I/1_2.7.8.5_PHOSPHAGLYPSYN-RXN : 1.0 CDP-1,2-diacyl-sn-glycerol + 1.0 sn-glycerol_3-phosphate
<=> 1.0 H+ + 1.0 CMP + 1.0 Phosphatidylglycerophosphate
cardiolipin-biosyn-I/2_3.1.3.27_PGPPHOSPHA-RXN : 1.0 Phosphatidylglycerophosphate + 1.0 H2O -> 1.0 phosphate + 1.0
Phosphatidylglycerol
cardiolipin-biosyn-I/3_2.7.8._CARDIOLIPSYN-RXN : 2.0 Phosphatidylglycerol -> 1.0 a_cardiolipin + 1.0 glycerol
##### glycerol degradation I #####
glycerol-degradation-I_2.7.1.30_GLYCEROL-KIN-RXN : 1.0 glycerol + 1.0 ATP -> 1.0 ADP + 1.0 sn-glycerol_3-phosphate
+ 1.0 H+
##### UDP-N-acetyl-D-glucosamine biosynthesis I #####
UDP-N-acetyl-D-glucosamine-biosyn-I/1_2.6.1.16_L-GLN-FRUCT-6-P-AMINOTRANS-RXN : 1.0 L-glutamine + 1.0
beta-D-fructofuranose_6-phosphate <=> 1.0 D-glucosamine_6-phosphate + 1.0 L-glutamate
UDP-N-acetyl-D-glucosamine-biosyn-I/2_5.4.2.10_5.4.2.10-RXN : 1.0 D-glucosamine_6-phosphate <=> 1.0
D-glucosamine_1-phosphate
UDP-N-acetyl-D-glucosamine-biosyn-I/3_2.3.1.157_2.3.1.157-RXN : 1.0 acetyl-CoA + 1.0 D-glucosamine_1-phosphate ->
1.0 N-acetyl-alpha-D-glucosamine_1-phosphate + 1.0 coenzyme_A + 1.0 H+
UDP-N-acetyl-D-glucosamine-biosyn-I/4_2.7.7.23_NAG1P-URIDYLTRANS-RXN : 1.0 H+ + 1.0 UTP + 1.0
N-acetyl-alpha-D-glucosamine_1-phosphate -> 1.0 UDP-N-acetyl-alpha-D-glucosamine + 1.0 diphosphate
##### UDP-N-acetyl-D-galactosamine biosynthesis I #####
UDP-N-acetyl-D-galactosamine-biosyn-I_5.1.3.2_UDP-N-ACETYLGLUCOSAMINE-4-EPIMERASE-RXN : 1.0
UDP-N-acetyl-alpha-D-glucosamine <=> 1.0 UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine
##### GDP-mannose biosyn #####
GDP-mannose-biosyn/1_5.3.1.8_MANNPISOM-RXN : 1.0 D-mannopyranose_6-phosphate <=> 1.0
beta-D-fructofuranose_6-phosphate
GDP-mannose-biosyn/2_5.4.2.8_PHOSMANMUT-RXN : 1.0 alpha-D-mannose_1-phosphate <=> 1.0 D-mannopyranose_6-phosphate
GDP-mannose-biosyn/3_2.7.7.13_2.7.7.13-RXN : 1.0 alpha-D-mannose_1-phosphate + 1.0 H+ + 1.0 GTP -> 1.0
GDP-alpha-D-mannose + 1.0 diphosphate
##### UDP-glucose biosyn #####
UDP-glucose-biosyn/1_5.4.2.2_5.4.2.8_PHOSPHOGLUCMUT-RXN : 1.0 alpha-D-glucopyranose_1-phosphate <=> 1.0
D-glucose_6-phosphate
UDP-glucose-biosyn/2_2.7.7.9_GLUC1PURIDYLTRANS-RXN : 1.0 UTP + 1.0 alpha-D-glucopyranose_1-phosphate + 1.0 H+ <=>
1.0 UDP-alpha-D-glucose + 1.0 diphosphate
##### peptidoglycan biosynthesis I (meso-diaminopimelate containing) #####
peptidoglycan-biosyn-I/1_2.5.1.7_UDPNACETYLGLUCOSAMENOLPYRTRANS-RXN : 1.0 UDP-N-acetyl-alpha-D-glucosamine + 1.0
phosphoenolpyruvate -> 1.0 phosphate + 1.0 UDP-N-acetyl-alpha-D-glucosamine-enolpyruvate
peptidoglycan-biosyn-I/2_1.3.1.98_UDPNACETYLMURAMATEDEHYDROG-RXN : 1.0 NADP+ + 1.0 UDP-N-acetyl-alpha-D-muramate
<- 1.0 H+ + 1.0 NADPH + 1.0 UDP-N-acetyl-alpha-D-glucosamine-enolpyruvate
peptidoglycan-biosyn-I/3_6.3.2.8_UDP-NACMUR-ALA-LIG-RXN : 1.0 L-alanine + 1.0 ATP + 1.0
UDP-N-acetyl-alpha-D-muramate -> 1.0 phosphate + 1.0 UDP-N-acetyl-alpha-D-muramoyl-L-alanine + 1.0 ADP + 1.0
H+
D-glutamate_5.1.1.3_GLUTRACE-RXN : 1.0 L-glutamate <=> 1.0 D-glutamate
peptidoglycan-biosyn-I/4_6.3.2.9_UDP-NACMURALA-GLU-LIG-RXN : 1.0 D-glutamate + 1.0
UDP-N-acetyl-alpha-D-muramoyl-L-alanine + 1.0 ATP -> 1.0 phosphate + 1.0 ADP + 1.0
UDP-N-acetyl-alpha-D-muramoyl-L-alanyl-D-glutamate + 1.0 H+
peptidoglycan-biosyn-I/5_6.3.2.13_UDP-NACMURALGLDAPLIG-RXN : 1.0 meso-diaminopimelate + 1.0 ATP +
1.0 UDP-N-acetyl-alpha-D-muramoyl-L-alanyl-D-glutamate -> 1.0 H+ + 1.0 phosphate + 1.0 ADP + 1.0
UDP-N-acetyl-alpha-D-muramoyl-L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-2,6-diaminopimelate
D-alanyl-D-alanine/1_5.1.1.1_ALARACECAT-RXN : 1.0 L-alanine <=> 1.0 D-alanine
D-alanyl-D-alanine/2_6.3.2.4_DALADALALIG-RXN : 2.0 D-alanine + 1.0 ATP -> 1.0 phosphate + 1.0 D-alanyl-D-alanine +
1.0 ADP + 1.0 H+
peptidoglycan-biosyn-I/6_6.3.2.10_UDP-NACMURALGLDAPAALIG-RXN : 1.0 D-alanyl-D-alanine + 1.0 ATP + 1.0
UDP-N-acetyl-alpha-D-muramoyl-L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-2,6-diaminopimelate -> 1.0 H+ + 1.0 phosphate +
1.0 UDP-N-acetyl-alpha-D-muramoyl-L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-2,6-diaminopimeloyl-D-alanyl-D-alanine + 1.0 ADP

```

peptidoglycan-biosyn-I/p7\_3.6.1.27\_UNDECAPRENYL-DIPHOSPHATASE-RXN : 1.0 H2O + 1.0  
di-trans,octa-cis-undecaprenyl\_diphosphate -> 1.0 H+ + 1.0 di-trans,octa-cis-undecaprenyl\_phosphate + 1.0  
phosphate  
peptidoglycan-biosyn-I/7\_2.7.8.13\_PHOSNACMURPENTATTRANS-RXN : 1.0 di-trans,octa-cis-undecaprenyl\_phosphate +  
1.0 UDP-N-acetyl-alpha-D-muramoyl-L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-2,6-diaminopimeloyl-D-alanyl-D-alanine -> 1.0  
undecaprenyldiphospho-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-2,6-diaminopimeloyl-D-alanyl-D-alanine + 1.0  
UMP  
peptidoglycan-biosyn-I/8\_2.4.1.227\_NACGLCTRANS-RXN : 1.0 UDP-N-acetyl-alpha-D-glucosamine + 1.0  
undecaprenyldiphospho-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-2,6-diaminopimeloyl-D-alanyl-D-alanine  
<=> 1.0 H+ + 1.0 UDP + 1.0 ditrans,octacis-undecaprenyldiphospho-N-acetyl-(N-acetylglucosaminyl)muramoyl-L-alanyl-  
gamma-D-glutamyl-meso-2,6-diaminopimeloyl-D-alanyl-D-alanine  
# Based on HPLC-MS-studies [7]  
# Gly: -0.0453  
# meso-DAP: +0.0035  
# D-Ala: 2-0.6109 = +1.3891  
# Cross: 0.3107  
# deAc: 0.9278  
# H2O: -deAc -meso-DAP -D-Ala + Cross - Gly = -1.9644  
peptidoglycan-biosyn-I/10\_manual\_3.4.16.4\_3.5.1.104\_HD-murein-mods : 1.9644 H2O + 0.0453 glycine + 1.3891  
D-alanine + 1.0 ditrans,octacis-undecaprenyldiphospho-N-acetyl-(N-acetylglucosaminyl)muramoyl-L-alanyl-  
gamma-D-glutamyl-meso-2,6-diaminopimeloyl-D-alanyl-D-alanine -> 0.9278 acetate + 0.0035 meso-diaminopimelate + 1.0  
di-trans,octa-cis-undecaprenyl\_diphosphate + 1.0 H+ + 1.0 a\_peptidoglycan  
##### peptidoglycan degradation #####  
# H2O: 2 - Anh - acetate + 1 + glycine = 2.114  
# 1x ABC transport (appABCF)  
peptidoglycan-degr/1\_manual\_3.5.1.28\_3.2.1.96\_3.5.1.104\_HD-appABCF : 1.0 a\_peptidoglycan + 0.9278 acetate  
+ 3.114 H2O + 1.0 ATP -> 0.0035 1,6-anhydro-N-acetyl-beta-muramate + 0.9965 N-acetylmuramate + 1.0  
N-acetyl-beta-D-glucosamine + 0.6109 L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-2,6-diaminopimeloyl-D-alanine + 0.3856  
L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelate + 0.0035 L-alanyl-D-glutamate + 0.0453 glycine + 1.0 ADP + 1.0 H+ +  
1.0 phosphate  
peptidoglycan-degr/2a\_2.7.1.170\_RXN0-4621 : 1.0 1,6-anhydro-N-acetyl-beta-muramate + 1.0 ATP + 1.0 H2O -> 1.0 H+ +  
1.0 N-acetyl-beta-muramate\_6-phosphate + 1.0 ADP  
# Additional reaction of EC 2.7.1.59 shown for *C. acetobutylicum* [37]  
peptidoglycan-degr/2b\_manual\_2.7.1.59\_HD-2.7.1.59 : 1.0 N-acetylmuramate + 1.0 ATP -> 1.0 ADP + 1.0 H+ + 1.0  
N-acetyl-beta-muramate\_6-phosphate  
peptidoglycan-degr/3\_4.2.1.126\_RXN0-4641 : 1.0 H2O + 1.0 N-acetyl-beta-muramate\_6-phosphate <=> 1.0  
N-acetyl-D-glucosamine\_6-phosphate + 1.0 (R)-lactate  
peptidoglycan-degr/4\_2.7.1.59\_N-ACETYLGLUCOSAMINE-KINASE-RXN : 1.0 N-acetyl-beta-D-glucosamine + 1.0 ATP -> 1.0  
ADP + 1.0 H+ + 1.0 N-acetyl-D-glucosamine\_6-phosphate  
# N-acetylglucosamine degradation I  
N-acetylglucosamine-degr-I/1\_3.5.1.25\_NAG6PDEACET-RXN : 1.0 H2O + 1.0 N-acetyl-D-glucosamine\_6-phosphate -> 1.0  
acetate + 1.0 D-glucosamine\_6-phosphate  
N-acetylglucosamine-degr-I/2\_3.5.99.6\_BS363214 : 1.0 H2O + 1.0 D-glucosamine\_6-phosphate -> 1.0 ammonia + 1.0  
beta-D-fructofuranose\_6-phosphate  
# muropeptide degradation  
muropeptide-degr/1\_3.4.17.13\_RXN0-5227 : 1.0 L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-2,6-diaminopimeloyl-D-alanine + 1.0  
H2O -> 1.0 L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelate + 1.0 D-alanine  
muropeptide-degr/2\_RXN0-961 : 1.0 L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelate + 1.0 H2O -> 1.0  
L-alanyl-D-glutamate  
muropeptide-degr/3\_5.1.1.20\_RXN0-5228 : 1.0 L-alanyl-D-glutamate <=> 1.0 L-alanyl-L-glutamate  
muropeptide-degr/4\_3.4.13.18\_RXN0-6981 : 1.0 H2O + 1.0 L-alanyl-L-glutamate -> 1.0 L-glutamate + 1.0 L-alanine  
##### L-CWG biosynthesis #####  
L-CWG-biosyn/1a\_3.1.3.4\_PHOSPHATIDATE-PHOSPHATASE-RXN : 1.0 1,2-diacyl-sn-glycerol\_3-phosphate + 1.0 H2O -> 1.0  
1,2-diacyl-sn-glycerol + 1.0 phosphate  
L-CWG-biosyn/1b\_2.7.1.107\_DIACYLGLYKIN-RXN : 1.0 ATP + 1.0 1,2-diacyl-sn-glycerol -> 1.0 H+ + 1.0 ADP + 1.0  
1,2-diacyl-sn-glycerol\_3-phosphate  
L-CWG-biosyn/2\_2.4.1.315\_2.4.1.337\_2.4.1.157-RXN : 1.0 1,2-diacyl-sn-glycerol + 1.0 UDP-alpha-D-glucose -> 1.0  
3-D-Glucosyl-1,2-diacylglycerol + 1.0 H+ + 1.0 UDP  
L-CWG-biosyn/3\_2.4.1.315\_RXN-15117 : 1.0 3-D-Glucosyl-1,2-diacylglycerol + 1.0 UDP-alpha-D-glucose <=> 1.0  
|diacyl-3-0-gluc1-1-6-gluc-sn-glycerol| + 1.0 UDP + 1.0 H+  
L-CWG-biosyn/4\_2.4.1.315\_RXN-15118 : 1.0 |diacyl-3-0-gluc1-1-6-gluc-sn-glycerol| + 1.0 UDP-alpha-D-glucose <=> 1.0  
H+ + 1.0 |diacyl-3-Glc-16-Glc-16-Glc-glycerol| + 1.0 UDP  
##### Flagellin modification [38] #####  
flagellin-modification/1\_manual\_2.4.-\_HD-fla1 : 1.0 UDP-N-acetyl-alpha-D-glucosamine -> 1.0 UDP + 1.0 H+ + 1.0  
GluNAc-FlIC  
flagellin-modification/p1\_manual\_3.1.3.-\_HD-fla2 : 1.0 L-threonine + 1.0 phosphate <=> 1.0 H2O + 1.0  
3-phospho-L-threonine  
flagellin-modification/2\_manual\_3.1.4.-\_HD-fla3 : 1.0 GluNAc-FlIC + 1.0 3-phospho-L-threonine + 1.0 H+ -> 1.0 H2O +  
1.0 Thr-P-GluNAc-FlIC

```

flagellin-modification/3_manual_2.1.1.-_HD-fla4 : 1.0 Thr-P-GluNAc-FlaC + 1.0 S-adenosyl-L-methionine -> 1.0
Me-Thr-P-GluNAc-FlaC + 2.0 H+ + 1.0 S-adenosyl-L-homocysteine
##### glycogen biosynthesis I + degradation #####
glycogen-biosyn-I/1_2.7.7.27_GLUC1PADENYLTRANS-RXN : 1.0 H+ + 1.0 alpha-D-glucopyranose_1-phosphate + 1.0 ATP ->
1.0 diphosphate + 1.0 ADP-alpha-D-glucose
glycogen-biosyn-I/2_manual_2.4.1.21_HD-2.4.1.21 : 1.0 ADP-alpha-D-glucose -> 1.0 ADP + 1.0 |1-4-alpha-D-Glucan| +
1.0 H+
glycogen-biosyn-I/3_2.4.1.18_3.2.1.54_3.2.1.41_3.2.1.1_GLYCOGEN-BRANCH-RXN : 1.0 |1-4-alpha-D-Glucan| -> 1.0
|Glycogens|
glycogen-degr_manual_3.2.1.54_3.2.1.41_3.2.1.1_HD-Glycogen : 3.0 |Glycogens| + 1.0 H2O -> 1.0 |Maltodextrins|
glycogen-degr_3.2.1.133_3.2.1.1_RXN-12188 : 1.0 |Maltodextrins| + 1.0 H2O -> 1.0 D-glucose + 1.0
alpha,alpha-trehalose
glycogen-degr_2.4.1.64_2.4.1.8_ALPHAALPHA-TREHALOSE-PHOSPHORYLASE-RXN : 1.0 phosphate + 1.0 alpha,alpha-trehalose
<=> 1.0 beta-D-glucose_1-phosphate + 1.0 D-glucose
glycogen-degr_3.2.1.10_RXN-15910 : 1.0 alpha,alpha-trehalose + 1.0 H2O -> 2.0 D-glucose
glucose-degr/1_2.7.1.2_GLUCOKIN-RXN : 1.0 D-glucose + 1.0 ATP -> 1.0 D-glucose_6-phosphate + 1.0 H+ + 1.0 ADP
glucose-degr/2_5.4.2.6_BETA-PHOSPHOGLUCOMUTASE-RXN : 1.0 beta-D-glucose_1-phosphate <=> 1.0
beta-D-glucose_6-phosphate
glucose-degr/3_5.3.1.9_R03321 : 1.0 beta-D-glucose_6-phosphate <=> 1.0 beta-D-fructofuranose_6-phosphate
##### polymer biosynthesis #####
exopolysaccharide-biosynthesis/1_manual_2.4.1.12_HD-2.4.1.12 : 1.0 UDP-alpha-D-glucose -> 1.0 UDP + 1.0 cellulose +
1.0 H+
# 1 ATP per glucose subunit
exopolysaccharide-biosynthesis/2_transport : 1.0 cellulose + 1.0 ATP + 1.0 H2O -> 1.0 cellulose[ex] + 1.0 ADP +
1.0 phosphate + 1.0 H+
# CDIF630erm_02795; 50 exopolysaccharide-biosynthesis/3_manual_2.3.1.-_HD-PSac : 1.0 cellulose[ex] + 0.5
acetyl-CoA <=> 0.5 coenzyme_A + 1.0 acetyl-cellulose[ex]
# trimming; chain-length: 100
exopolysaccharide-biosynthesis/4_manual_3.2.1.4_HD-3.2.1.4 : 1.0 acetyl-cellulose[ex] + 0.01 H2O -> 1.0
exopolysaccharide[ex]
exopolysaccharide_exchange : exopolysaccharide[ex] ->
##### glutamate/mine #####
glutamate_6.3.1.2_GLUTAMINESYN-RXN : 1.0 ammonium + 1.0 L-glutamate + 1.0 ATP -> 1.0 L-glutamine + 1.0 ADP + 1.0 H+
+ 1.0 phosphate
glutamate_3.5.1.2_6.3.5.2_6.3.5.5_6.3.5.4_GLUTAMIN-RXN : 1.0 H2O + 1.0 L-glutamine -> 1.0 ammonium + 1.0
L-glutamate
glutamate_1.4.1.2_GLUTAMATE-DEHYDROGENASE-NADP+-RXN_WOP : 1.0 NAD+ + 1.0 H2O + 1.0 L-glutamate <=> 1.0 H+ + 1.0
NADH + 1.0 2-oxoglutarate + 1.0 ammonium
##### asp biosyn,asn biosyn I+II,asn degr. I #####
aspartate_2.6.1.1_ASPAMINOTRANS-RXN : 1.0 2-oxoglutarate + 1.0 L-aspartate <=> 1.0 L-glutamate + 1.0 oxaloacetate
aspartate_6.3.5.4_ASNSYNB-RXN : 1.0 L-glutamine + 1.0 ATP + 1.0 H2O + 1.0 L-aspartate -> 1.0 L-asparagine + 1.0
AMP + 1.0 H+ + 1.0 diphosphate + 1.0 L-glutamate
aspartate_6.3.1.1_6.3.5.4_ASNSYNA-RXN : 1.0 ATP + 1.0 ammonium + 1.0 L-aspartate -> 1.0 L-asparagine + 1.0 AMP +
1.0 H+ + 1.0 diphosphate
aspartate_3.5.5.4_3.5.1.1_ASPARAGHYD-RXN : 1.0 H2O + 1.0 L-asparagine -> 1.0 ammonium + 1.0 L-aspartate
##### lys biosyn II #####
lysine-biosyn-II/1_2.7.2.4_ASPARTATEKIN-RXN : 1.0 ATP + 1.0 L-aspartate -> 1.0 ADP + 1.0 L-aspartyl-4-phosphate
lysine-biosyn-II/2_1.2.1.11_ASPARTATE-SEMIALDEHYDE-DEHYDROGENASE-RXN : 1.0 NADP+ + 1.0 L-aspartate-semialdehyde +
1.0 phosphate <=> 1.0 L-aspartyl-4-phosphate + 1.0 H+ + 1.0 NADPH
lysine-biosyn-II/3_4.3.3.7_DIIHYDRODIPICSYN-RXN : 1.0 pyruvate + 1.0 L-aspartate-semialdehyde -> 1.0
(2S,4S)-4-hydroxy-2,3,4,5-tetrahydrodipicolinate + 1.0 H+ + 1.0 H2O
lysine-biosyn-II/4_1.17.1.8_RXN-14014 : 1.0 (S)-2,3,4,5-tetrahydrodipicolinate + 1.0 H2O + 1.0 NADP+ <- 1.0 H+ +
1.0 NADPH + 1.0 (2S,4S)-4-hydroxy-2,3,4,5-tetrahydrodipicolinate
lysine-biosyn-II/5_2.3.1.89_2.3.1.89-RXN : 1.0 H2O + 1.0 (S)-2,3,4,5-tetrahydrodipicolinate + 1.0 acetyl-CoA ->
1.0 coenzyme_A + 1.0 L-2-acetamido-6-oxoheptanedioate
lysine-biosyn-II/6_2.6.1.-_RXN-4822 : 1.0 L-2-acetamido-6-oxoheptanedioate + 1.0 L-glutamate -> 1.0 2-oxoglutarate
+ 1.0 N-acetyl-L,L-2,6-diaminopimelate
lysine-biosyn-II/7_3.5.1.47_N-ACETYLDIAMINOPIMELATE-DEACETYLASE-RXN : 1.0 N-acetyl-L,L-2,6-diaminopimelate + 1.0
H2O -> 1.0 acetate + 1.0 L,L-diaminopimelate
lysine-biosyn-II/8_5.1.1.7_DIAMINOPIMEPIM-RXN : 1.0 L,L-diaminopimelate <=> 1.0 meso-diaminopimelate
lysine-biosyn-II/9_4.1.1.20_DIAMINOPIMDECARB-RXN : 1.0 H+ + 1.0 meso-diaminopimelate -> 1.0 CO2 + 1.0 L-lysine
##### arginine biosyn II #####
arginine-biosyn-II/1_2.3.1.1_N-ACETYLTRANSFER-RXN : 1.0 L-glutamate + 1.0 acetyl-CoA <=> 1.0 N-acetyl-L-glutamate +
1.0 coenzyme_A + 1.0 H+
arginine-biosyn-II/2_2.7.2.8_ACETYLGLUTKIN-RXN : 1.0 ATP + 1.0 N-acetyl-L-glutamate -> 1.0
N-acetylglutamyl-phosphate + 1.0 ADP
arginine-biosyn-II/3_1.2.1.38_N-ACETYLGLUTPREDUCT-RXN : 1.0 phosphate + 1.0 NADP+ + 1.0
N-acetyl-L-glutamate_5-semialdehyde <=> 1.0 N-acetylglutamyl-phosphate + 1.0 H+ + 1.0 NADPH
arginine-biosyn-II/4_2.6.1.11_ACETYLORNTANSAM-RXN : 1.0 N-acetyl-L-ornithine + 1.0 2-oxoglutarate <=> 1.0

```

N-acetyl-L-glutamate\_5-semialdehyde + 1.0 L-glutamate  
arginine-biosyn-II/5\_2.3.1.35\_GLUTAMATE-N-ACETYLTRANSFERASE-RXN : 1.0 N-acetyl-L-ornithine + 1.0 L-glutamate -> 1.0 N-acetyl-L-glutamate + 1.0 L-ornithine  
arginine-biosyn-II/p6\_6.3.5.5\_CARBSYN-RXN : 2.0 ATP + 1.0 H2O + 1.0 L-glutamine + 1.0 hydrogen\_carbonate -> 2.0 ADP + 1.0 phosphate + 1.0 L-glutamate + 1.0 carbamoyl\_phosphate + 2.0 H+  
arginine-biosyn-II/6\_2.1.3.3\_ORNCARBAMTRANSFER-RXN : 1.0 carbamoyl\_phosphate + 1.0 L-ornithine <=> 1.0 phosphate + 1.0 L-citrulline + 1.0 H+  
arginine-biosyn-II/7\_6.3.4.5\_ARGSUCCINSYN-RXN : 1.0 L-citrulline + 1.0 L-aspartate + 1.0 ATP -> 1.0 diphosphate + 1.0 L-arginino-succinate + 1.0 AMP + 1.0 H+  
arginine-biosyn-II/8\_4.3.2.1\_ARGSUCCINLYA-RXN : 1.0 L-arginino-succinate <=> 1.0 fumarate + 1.0 L-arginine  
##### arginine degr #####  
arginine-degradation/1\_3.5.3.6\_ARGININE-DEIMINASE-RXN : 1.0 L-arginine + 1.0 H2O -> 1.0 ammonium + 1.0 L-citrulline  
# 3.5.1.87 assumed to use citrulline as substrate  
arginine-degradation/2\_3.5.1.87\_CITRULLINASE-RXN : 2.0 H+ + 1.0 L-citrulline + 1.0 H2O -> 1.0 CO2 + 1.0 ammonium + 1.0 L-ornithine  
##### putrescine/spermidine biosyn #####  
putrescine-biosyn-I/1\_4.1.1.19\_ARGDECARBOX-RXN : 1.0 H+ + 1.0 L-arginine -> 1.0 CO2 + 1.0 agmatine  
putrescine-biosyn-I/2\_3.5.3.11\_AGMATIN-RXN : 1.0 H2O + 1.0 agmatine -> 1.0 putrescine + 1.0 urea  
spermidine-biosyn-I/1\_4.1.1.50\_SAMDECARB-RXN : 1.0 S-adenosyl-L-methionine + 1.0 H+ -> 1.0 S-adenosyl\_3-(methylthio)propylamine + 1.0 CO2  
spermidine-biosyn-I/2\_2.5.1.16\_SPERMIDINESYN-RXN : 1.0 putrescine + 1.0 S-adenosyl\_3-(methylthio)propylamine <=> 1.0 H+ + 1.0 S-methyl-5'-thioadenosine + 1.0 spermidine  
# possible side reaction  
spermine-biosynthesis\_2.5.1.16\_SPERMINE-SYNTHASE-RXN : 1.0 spermidine + 1.0 S-adenosyl\_3-(methylthio)propylamine -> 1.0 H+ + 1.0 S-methyl-5'-thioadenosine + 1.0 spermine  
N-acetylputrescine-biosyn\_2.3.1.57\_RXN-0 : 1.0 putrescine + 1.0 acetyl-CoA -> 1.0 coenzyme\_A + 1.0 N-acetylputrescine + 1.0 H+  
N-acetylspermidine-biosyn\_2.3.1.57\_SPERMATRAN-RXN : 1.0 acetyl-CoA + 1.0 spermidine -> 1.0 coenzyme\_A + 1.0 N1-acetylspermidine + 1.0 H+  
N-acetylspermine-biosyn\_2.3.1.57\_RXN-9939 : 1.0 spermine + 1.0 acetyl-CoA -> 1.0 coenzyme\_A + 1.0 N1-acetylspermine + 1.0 H+  
N-diacetylspermine-biosyn\_2.3.1.57\_BS321087 : 1.0 acetyl-CoA + 1.0 N1-acetylspermine -> 1.0 N1,N12-diacetylspermine + 1.0 coenzyme\_A  
##### S-methyl-5'-thioadenosine degradation #####  
S-methyl-5'-thioadenosine-degr\_3.2.2.16\_3.2.2.9\_METHYLTHIOADENOSINE-NUCLEOSIDASE-RXN : 1.0 H2O + 1.0 S-methyl-5'-thioadenosine -> 1.0 adenine + 1.0 S-methyl-5-thio-D-ribose  
S-methyl-5'-thioadenosine-degr\_3.2.2.9\_5-METHYLTHIOADENOSINE-PHOSPHORYLASE-RXN : 1.0 S-methyl-5'-thioadenosine + 1.0 phosphate -> 1.0 adenine + 1.0 S-methyl-5-thio-alpha-D-ribose\_1-phosphate  
##### S-adenosyl-L-methionine cycle I #####  
S-adenosyl-L-methionine-cycle-I/1\_3.2.2.9\_ADENOSYLHOMOCYSTEINE-NUCLEOSIDASE-RXN : 1.0 S-adenosyl-L-homocysteine + 1.0 H2O -> 1.0 adenine + 1.0 S-ribosyl-L-homocysteine  
S-adenosyl-L-methionine-cycle-I/2\_4.4.1.21\_RIBOSYLHOMOCYSTEINASE-RXN : 1.0 S-ribosyl-L-homocysteine -> 1.0 autoinducer\_2 + 1.0 L-homocysteine  
S-adenosyl-L-methionine-cycle-I/3\_2.1.1.13\_HOMOCYMETB12-RXN : 1.0 N5-methyl-tetrahydrofolate + 1.0 L-homocysteine -> 1.0 tetrahydropteroyl\_tri-L-glutamate + 1.0 L-methionine  
S-adenosyl-L-methionine-cycle-I/4\_2.5.1.6\_S-ADENMETSYN-RXN : 1.0 L-methionine + 1.0 ATP + 1.0 H2O -> 1.0 diphosphate + 1.0 S-adenosyl-L-methionine + 1.0 phosphate  
# GAP: 2.1.1.; mostly DNA or t/rRNA  
# auto-inducer  
autoinducer-AI-2-biosyn/1\_spontaneous\_RXN-10015 : 1.0 autoinducer\_2 -> 1.0 (2R,4S)-2-methyl-2,4-dihydroxydihydrofuran-3-one  
autoinducer-AI-2-biosyn/2\_spontaneous\_RXN-10017 : 1.0 H2O + 1.0 (2R,4S)-2-methyl-2,4-dihydroxydihydrofuran-3-one -> 1.0 (2R,4S)-2-methyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran  
##### met biosyn C #####  
methionine-biosyn/1\_2.3.1.46\_HOMSUCTRAN-RXN : 1.0 succinyl-CoA + 1.0 L-homoserine -> 1.0 coenzyme\_A + 1.0 O-succinyl-L-homoserine  
methionine-biosyn/2\_2.5.1.49\_RXN-9384 : 1.0 O-succinyl-L-homoserine + 1.0 hydrogen\_sulfide <=> 1.0 L-homocysteine + 1.0 H+ + 1.0 succinate  
##### met degr II #####  
methionine-degr-II\_4.4.1.11\_RXN-14301 : 1.0 L-methionine -> 1.0 H+ + 1.0 (2Z)-2-aminobut-2-enoate + 1.0 methanethiol  
##### 2-amino-2-enoate degradation #####  
2-aminobut-2-enoate-degr/1\_spontaneous\_4.4.1.1.4.3.1.19\_3.5.99.7\_4.4.1.2\_RXN-15121 : 1.0 (2Z)-2-aminobut-2-enoate -> 1.0 2-iminobutanoate  
2-aminobut-2-enoate-degr/2\_spontaneous\_3.5.99.7\_3.5.99.10\_4.4.1.1.4.3.1.19\_4.4.1.2\_3.5.99.\_RXN-15123 : 1.0 H2O + 1.0 H+ + 1.0 2-iminobutanoate -> 1.0 2-oxobutanoate + 1.0 ammonium  
2-aminoprop-2-enoate-degr/1\_spontaneous\_4.4.1.8\_4.4.1.13\_4.4.1.25\_4.3.1.17\_4.4.1.28\_RXN-15124 : 1.0 2-aminoprop-2-enoate -> 1.0 2-iminopropanoate

## Anhang

---

```
2-aminoprop-2-enoate-degr/2_spontaneous_4.4.1.8_4.4.1.13_4.3.1.17_4.4.1.28_3.5.99.10_4.4.1.25_RXN-15127 : 1.0 H2O +
1.0 2-iminopropanoate + 1.0 H+ -> 1.0 ammonium + 1.0 pyruvate
##### 2-aminobutanoate #####
2-aminobutanoate_2.6.1.42_BS356546 : 1.0 (S)-2-aminobutanoate + 1.0 2-oxoglutarate <- 1.0 2-oxobutanoate + 1.0
L-glutamate
##### threonine biosyn #####
threonine-from-homoserine/0_1.1.1.3_HOMOSERDEHYDROG-RXN : 1.0 NADP+ + 1.0 L-homoserine <- 1.0 H+ + 1.0
L-aspartate-semialdehyde + 1.0 NADPH
threonine-from-homoserine/1_2.7.1.39_HOMOSERKIN-RXN : 1.0 L-homoserine + 1.0 ATP -> 1.0 H+ + 1.0 ADP + 1.0
O-phospho-L-homoserine
threonine-from-homoserine/2_4.2.3.1_THRESYN-RXN : 1.0 H2O + 1.0 O-phospho-L-homoserine -> 1.0 phosphate + 1.0
L-threonine
##### threonine degr #####
threonine-degr-IV_4.1.2.5_THREONINE-ALDOLASE-RXN : 1.0 L-threonine -> 1.0 glycine + 1.0 acetaldehyde
threonine-degr-V_4.3.1.19_RXN-15122 : 1.0 L-threonine -> 1.0 (2Z)-2-aminobut-2-enoate + 1.0 H+ + 1.0 H2O
threonine-degr-II/1_1.1.1.103_THREODEHYD-RXN : 1.0 L-threonine + 1.0 NAD+ -> 1.0 L-2-amino-3-oxobutanoate + 1.0
NADH + 1.0 H+
threonine-degr-II/2_spontaneous_THREOSPON-RXN : 1.0 L-2-amino-3-oxobutanoate + 1.0 H+ -> 1.0 aminoacetone + 1.0
CO2
##### homoserine degr #####
# C. sporogenes [39] enzyme homolog
homoserine-degr_4.4.1.1_4.3.1.19_4.4.1.11_HOMOSERDEAM-RXN : 1.0 L-homoserine -> 1.0 2-oxobutanoate + 1.0 ammonium
##### serine biosyn #####
serine-biosyn_2.1.2.1_GLYOHMETRANS-RXN : 1.0 tetrahydropteroyl-tri-L-glutamate + 1.0 L-serine <=> 1.0 glycine +
1.0 H2O + 1.0 5,10-methylene-tetrahydrofolate
##### serine degr #####
serine-degr-A_4.3.1.17_RXN-15125 : 1.0 L-serine -> 1.0 H2O + 1.0 2-aminoprop-2-enoate + 1.0 H+
serine-degr-B/1a_2.6.1.51_SERINE-PYRUVATE-AMINOTRANSFERASE-RXN : 1.0 L-serine + 1.0 pyruvate <=> 1.0
hydroxypyruvate + 1.0 L-alanine
serine-degr-B/1b_2.6.1.2_RXN-974 : 1.0 L-serine + 1.0 2-oxoglutarate <=> 1.0 L-glutamate + 1.0 hydroxypyruvate
serine-degr-B/2a_1.1.1.81_1.1.1.60_GLYCERATE-DEHYDROGENASE-RXN : 1.0 NAD+ + 1.0 D-glycerate <- 1.0 NADH + 1.0
hydroxypyruvate + 1.0 H+
serine-degr-B/2b_1.1.1.81_RXN0-300 : 1.0 D-glycerate + 1.0 NADP+ <- 1.0 hydroxypyruvate + 1.0 NADPH + 1.0 H+
serine-degr-B/3_2.7.1.31_GLY3KIN-RXN : 1.0 ATP + 1.0 D-glycerate -> 1.0 ADP + 1.0 3-phospho-D-glycerate + 1.0 H+
##### sec biosyn I #####
selenocysteine-biosyn-I/1_2.7.9.3_2.7.9.3-RXN : 1.0 H2O + 1.0 selenide + 1.0 ATP -> 1.0 selenophosphate + 1.0
phosphate + 1.0 AMP
selenocysteine-biosyn-I/2_2.9.1.1_2.9.1.1-RXN : 1.0 selenophosphate + 1.0 [L-seryl-SEC-tRNAs] -> 1.0 phosphate +
1.0 [Charged-SEC-tRNAs]
seleno-amino-acid-biosynthesis_2.5.1.47_RXN-12726 : 1.0 O-acetyl-L-serine + 1.0 hydrogen_selenide -> 1.0 acetate +
1.0 L-selenocysteine + 1.0 H+
##### sec degr C #####
# NADH as a guess
selenocysteine-degr_mod_4.4.1.16_mod_SELENOCYSTEINE-LYASE-RXN : 1.0 NADPH + 1.0 L-selenocysteine -> 1.0 selenide +
1.0 NADP+ + 1.0 L-alanine + 1.0 H+
##### cys biosyn I #####
cysteine-biosyn-I/1_2.5.1.47_ACSELY-RXN : 1.0 hydrogen_sulfide + 1.0 O-acetyl-L-serine <=> 1.0 acetate + 1.0
L-cysteine + 1.0 H+
cysteine-biosyn-I/2_2.3.1.30_SERINE-O-ACETTRAN-RXN : 1.0 L-serine + 1.0 acetyl-CoA -> 1.0 O-acetyl-L-serine + 1.0
coenzyme_A
##### cys degr II #####
cysteine-degr-II_4.4.1.8_4.4.1.1_LCYSDSULF-RXN : 1.0 H2O + 1.0 L-cysteine -> 1.0 pyruvate + 1.0 hydrogen_sulfide +
1.0 ammonium
##### sulfite degr #####
sulfite-degr_manual_1.8.1.-_HD-sulf : 1.0 sulfite + 3.0 NADH + 5.0 H+ <=> 3.0 H2O + 1.0 hydrogen_sulfide + 3.0
NAD+
##### histidine biosyn #####
histidine-biosyn/1_2.4.2.17_ATPPHOSPHORIBOSYLTRANS-RXN : 1.0 diphosphate + 1.0 1-(5-phospho-beta-D-ribosyl)-ATP
<=> 1.0 H+ + 1.0 ATP + 1.0 5-phospho-alpha-D-ribose_1-diphosphate
histidine-biosyn/2_3.6.1.31_HISTPRATPHYD-RXN : 1.0 H2O + 1.0 1-(5-phospho-beta-D-ribosyl)-ATP -> 1.0
1-(5-phospho-beta-D-ribosyl)-AMP + 2.0 H+ + 1.0 diphosphate
histidine-biosyn/3_3.5.4.19_HISTCYCLOHYD-RXN : 1.0 1-(5-phospho-beta-D-ribosyl)-AMP + 1.0 H2O -> 1.0
1-(5-phospho-beta-D-ribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)methylideneamino]imidazole-4-carboxamide
histidine-biosyn/4_5.3.1.16_PRIIFAICARPISOM-RXN : 1.0 1-(5-phospho-beta-D-ribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)
methylideneamino]imidazole-4-carboxamide -> 1.0 phosphoribulosylformimino-AICAR-P
histidine-biosyn/5_4.1.3.-_2.4.2.-_GLUTAMIDOTRANS-RXN : 1.0 phosphoribulosylformimino-AICAR-P + 1.0 L-glutamine ->
1.0 D-erythro-imidazole-glycerol-phosphate + 1.0 H+ + 1.0 5-amino-1-(5-phospho-D-ribosyl)imidazole-4-carboxamide +
1.0 L-glutamate
histidine-biosyn/6_4.2.1.19_IMIDPHOSDEHYD-RXN : 1.0 D-erythro-imidazole-glycerol-phosphate -> 1.0
```

```
imidazole_acetol-phosphate + 1.0 H2O
histidine-biosyn/7_2.6.1.9_HISTAMINOTRANS-RXN : 1.0 L-glutamate + 1.0 imidazole_acetol-phosphate -> 1.0
2-oxoglutarate + 1.0 L-histidinol-phosphate
histidine-biosyn/8_3.1.3.15_HISTIDPHOS-RXN : 1.0 H2O + 1.0 L-histidinol-phosphate -> 1.0 histidinol + 1.0
phosphate
histidine-biosyn/9_1.1.1.23_HISTOLDEHYD-RXN : 1.0 histidinol + 1.0 NAD+ -> 1.0 NADH + 1.0 histidinal + 1.0 H+
histidine-biosyn/10_1.1.1.23_HISTALDEHYD-RXN : 1.0 histidinal + 1.0 H2O + 1.0 NAD+ -> 2.0 H+ + 1.0 NADH + 1.0
L-histidine
##### alanine biosyn #####
alanine-biosyn_4.1.1.12_ASPARTATE-4-DECARBOXYLASE-RXN : 1.0 H+ + 1.0 L-aspartate -> 1.0 CO2 + 1.0 L-alanine
alanine-biosyn_2.6.1.2_ALANINE-AMINOTRANSFERASE-RXN : 1.0 L-alanine + 1.0 2-oxoglutarate <=> 1.0 pyruvate + 1.0
L-glutamate
##### ornithine degr. II #####
ornithine-degr-II/1_5.1.1.12_ORNITHINE-RACEMASE-RXN : 1.0 L-ornithine <=> 1.0 D-ornithine
ornithine-degr-II/2_5.4.3.5_ORNMUTST-RXN : 1.0 D-ornithine <=> 1.0 (2R,4S)-2,4-diaminopentanoate
ornithine-degr-II/3_1.4.1.12_24-DIAMINOPENTANOATE-DEHYDROGENASE-RXN_WOP : 1.0 (2R,4S)-2,4-diaminopentanoate + 1.0
H2O + 1.0 NAD+ <=> 1.0 ammonium + 1.0 NADH + 1.0 H+ + 1.0 2-amino-4-oxopentanoate
ornithine-degr-II/4_2.3.1.10_AKPTHIOL-RXN : 1.0 2-amino-4-oxopentanoate + 1.0 coenzyme_A <=> 1.0 acetyl-CoA + 1.0
D-alanine
##### pro degr #####
proline-degr/1_5.1.1.4_PROLINE-RACEMASE-RXN : 1.0 L-proline <=> 1.0 D-proline
proline-degr/2_1.21.4.1_BS370299 : 1.0 H+ + 1.0 D-proline + 1.0 NADH <=> 1.0 5-aminopentanoate + 1.0 NAD+
##### glycine degr. #####
glycine-cleavage/1_moddir_1.4.4.2_GCVF-RXN : 1.0 glycine + 1.0 lipoamide + 1.0 H+ <=> 1.0 CO2 + 1.0
[glycine-cleavage_complex_H_protein]_N6-aminomethyldihydrolipoyl-L-lysine
glycine-cleavage/2_2.1.2.10_GCVT-RXN : 1.0 tetrahydropteroyl-tri-L-glutamate + 1.0
[glycine-cleavage_complex_H_protein]_N6-aminomethyldihydrolipoyl-L-lysine <=> 1.0 dihydrolipoamide + 1.0
5,10-methylene-tetrahydrofolate + 1.0 ammonium
glycine-cleavage/3_1.8.1.4_RXN-7719 : 1.0 NAD+ + 1.0 dihydrolipoamide <=> 1.0 lipoamide + 1.0 NADH + 1.0 H+
glycine-degr/1_1.21.4.2_RXN-7566 : 1.0 [Ox-Thioredoxin] + 1.0 H2O + 1.0 ammonium + 1.0 acetyl_phosphate <- 1.0
[Red-Thioredoxin] + 1.0 H+ + 1.0 phosphate + 1.0 glycine
glycine-degr/2_1.8.1.9_THIOREDOXIN-REDUCT-NADPH-RXN : 1.0 NADP+ + 1.0 [Red-Thioredoxin] <- 1.0 NADPH + 1.0 H+ +
1.0 [Ox-Thioredoxin]
##### chorismate biosyn I #####
chorismate-biosyn-I/1_2.5.1.54_DAHPSYN-RXN : 1.0 H2O + 1.0 phosphoenolpyruvate + 1.0 D-erythrose_4-phosphate <=>
1.0 phosphate + 1.0 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate
chorismate-biosyn-I/2_4.2.3.4_3-DEHYDROQUINATE-SYNTHASE-RXN : 1.0 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate ->
1.0 phosphate + 1.0 3-dehydroquininate
chorismate-biosyn-I/3_4.2.1.10_3-DEHYDROQUINATE-DEHYDRATASE-RXN : 1.0 3-dehydroquininate <=> 1.0 H2O + 1.0
3-dehydroshikimate
chorismate-biosyn-I/4_1.1.1.25_RXN-7968 : 1.0 shikimate + 1.0 NADP+ <- 1.0 3-dehydroshikimate + 1.0 H+ + 1.0 NADPH
chorismate-biosyn-I/5_2.7.1.71_SHIKIMATE-KINASE-RXN : 1.0 ATP + 1.0 shikimate -> 1.0 H+ + 1.0 ADP + 1.0
shikimate_3-phosphate
chorismate-biosyn-I/6_2.5.1.19_2.5.1.19-RXN : 1.0 phosphoenolpyruvate + 1.0 shikimate_3-phosphate <=> 1.0
5-enolpyruvyl-shikimate_3-phosphate + 1.0 phosphate
chorismate-biosyn-I/7_4.2.3.5_CHORISMATE-SYNTHASE-RXN : 1.0 5-enolpyruvyl-shikimate_3-phosphate -> 1.0 phosphate +
1.0 chorismate
##### tyr/phe biosyn #####
tyr/phe-biosyn_5.4.99.5_CHORISMATEMUT-RXN : 1.0 chorismate <=> 1.0 prephenate
tyrosine-biosyn_I/1_1.3.1.12_PREPHENATEDEHYDROG-RXN : 1.0 prephenate + 1.0 NAD+ -> 1.0 4-hydroxyphenylpyruvate +
1.0 CO2 + 1.0 NADH
tyrosine-biosyn_I/2a_2.6.1.9_2.6.1.1_2.6.1.57_TYROSINE-AMINOTRANSFERASE-RXN : 1.0 L-tyrosine + 1.0 2-oxoglutarate
<=> 1.0 4-hydroxyphenylpyruvate + 1.0 L-glutamate
tyrosine-biosyn_I/2b_2.6.1.51_RXN30-4157 : 1.0 L-tyrosine + 1.0 pyruvate <=> 1.0 L-alanine + 1.0
4-hydroxyphenylpyruvate
phenylalanine-biosyn-I/1_4.2.1.51_PREPHENATEDEHYDRAT-RXN : 1.0 prephenate + 1.0 H+ -> 1.0 2-oxo-3-phenylpropanoate
+ 1.0 CO2 + 1.0 H2O
phenylalanine-biosyn-I/2a_2.6.1.57_2.6.1.9_2.6.1.1_2.6.1.42_PHEAMINOTRANS-RXN : 1.0 L-glutamate + 1.0
2-oxo-3-phenylpropanoate <=> 1.0 2-oxoglutarate + 1.0 L-phenylalanine
phenylalanine-biosyn-I/2b_2.6.1.57_RXN-7708 : 1.0 2-oxo-3-phenylpropanoate + 1.0 L-methionine <=> 1.0
2-oxo-4-methylthiobutanoate + 1.0 L-phenylalanine
# side reactions
phenylalanine-biosyn-II/1_2.6.1.57_PREPHENATE-ASP-TRANSAMINE-RXN : 1.0 oxaloacetate + 1.0 L-arogenate <=> 1.0
L-aspartate + 1.0 prephenate
phenylalanine-biosyn-II/2_4.2.1.51_CARBOXYCYCLOHEXADIENYL-DEHYDRATASE-RXN : 1.0 H+ + 1.0 L-arogenate -> 1.0
L-phenylalanine + 1.0 CO2 + 1.0 H2O
methionine-from-2-oxo-4-methylthiobutanoate_2.6.1.57_RXN-14147 : 1.0 2-oxoglutarate + 1.0 L-methionine <=> 1.0
2-oxo-4-methylthiobutanoate + 1.0 L-glutamate
##### trp/tyr/phe/his degr #####
```

```

tryptophan-degr_2.6.1.27_TRYPTOPHAN-AMINOTRANSFERASE-RXN : 1.0 L-tryptophan + 1.0 2-oxoglutarate <=> 1.0
L-glutamate + 1.0 indole-3-pyruvate
tryptophan-degr_2.6.1.57_RXN-14685 : 1.0 indole-3-pyruvate + 1.0 L-methionine <=> 1.0 2-oxo-4-methylthiobutanoate +
1.0 L-tryptophan
histidine-degr_2.6.1.38_HISTTRANSAM-RXN : 1.0 L-histidine + 1.0 2-oxoglutarate <=> 1.0 imidazole-pyruvate + 1.0
L-glutamate
tryptophan-ox/1_1.2.7.8_1.2.7.8-RXN : 1.0 coenzyme_A + 2.0 [Oxidized-ferredoxins] + 1.0 indole-3-pyruvate -> 2.0
[Reduced-ferredoxins] + 1.0 S-2-(indol-3-yl)acetyl-CoA + 1.0 H+ + 1.0 CO2
tyrosine-ox/1_manual_1.2.7.8_HD-1.2.7.8-tyr : 1.0 4-hydroxyphenylpyruvate + 2.0 [Oxidized-ferredoxins] + 1.0
coenzyme_A -> 1.0 CO2 + 2.0 [Reduced-ferredoxins] + 1.0 4-hydroxyphenylacetyl-CoA + 1.0 H+
phenylalanine-ox/1_manual_1.2.7.8_HD-1.2.7.8-phe : 1.0 2-oxo-3-phenylpropanoate + 2.0 [Oxidized-ferredoxins] + 1.0
coenzyme_A -> 1.0 CO2 + 2.0 [Reduced-ferredoxins] + 1.0 phenylacetyl-CoA
histidine-ox/1_manual_1.2.7.8_HD-1.2.7.8-his : 1.0 imidazole-pyruvate + 2.0 [Oxidized-ferredoxins] + 1.0
coenzyme_A -> 1.0 CO2 + 2.0 [Reduced-ferredoxins] + 1.0 imidazolyacetyl-CoA
tryptophan-ox/2_manual_2.3.1.-_HD-2.3.1.-trp : 1.0 S-2-(indol-3-yl)acetyl-CoA + 1.0 phosphate -> 1.0
indole-3-acetyl_phosphate + 1.0 coenzyme_A
tyrosine-ox/2_2.3.1.-_manual_HD-2.3.1.-tyr : 1.0 4-hydroxyphenylacetyl-CoA + 1.0 phosphate -> 1.0
4-hydroxyphenylacetyl_phosphate + 1.0 coenzyme_A
phenylalanine-ox/2_2.3.1.-_manual_HD-2.3.1.-phe : 1.0 phenylacetyl-CoA + 1.0 phosphate -> 1.0
phenylacetyl_phosphate + 1.0 coenzyme_A
histidine-ox/2_2.3.1.-_manual_HD-2.3.1.-his : 1.0 imidazolyacetyl-CoA + 1.0 phosphate -> 1.0
imidazolyacetyl_phosphate + 1.0 coenzyme_A
tryptophan-ox/3_manual_2.7.2.-_HD-2.7.2.-trp : 1.0 indole-3-acetyl_phosphate + 1.0 ADP -> 1.0 indole-3-acetate +
1.0 ATP
tyrosine-ox/3_manual_2.7.2.-_HD-2.7.2.-tyr : 1.0 4-hydroxyphenylacetyl_phosphate + 1.0 ADP -> 1.0
4-hydroxyphenylacetate + 1.0 ATP
phenylalanine-ox/3_manual_2.7.2.-_HD-2.7.2.-phe : 1.0 phenylacetyl_phosphate + 1.0 ADP -> 1.0 phenylacetate + 1.0
ATP
histidine-ox/3_manual_2.7.2.-_HD-2.7.2.-his : 1.0 imidazolyacetyl_phosphate + 1.0 ADP -> 1.0 4-imidazoleacetate +
1.0 ATP
tyrosine-ox/4_4.1.1.83_4.1.1.83-RXN : 1.0 H+ + 1.0 4-hydroxyphenylacetate -> 1.0 CO2 + 1.0 4-methylphenol
##### arom red #####
phe-red/1_1.1.1.222_BS186998 : 1.0 (R)-phenyllactate + 1.0 NAD+ <- 1.0 H+ + 1.0 NADH + 1.0
2-oxo-3-phenylpropanoate
phe-red/2_manual_2.8.3.-_HD-2.8.3.-phe : 1.0 (R)-phenyllactoyl-CoA + 1.0 3-phenylpropanoate <=> 1.0
3-phenylpropanoyl-CoA + 1.0 (R)-phenyllactate
phe-red/3_manual_4.2.1.-_HD-4.2.1.-phe : 1.0 (R)-phenyllactoyl-CoA -> 1.0 3-phenylacryloyl-CoA + 1.0 H2O
phe-red/4_manual_1.3.98.-_HD-1.3.98.-phe : 1.0 3-phenylacryloyl-CoA + 2.0 NADH + 2.0 [Oxidized-ferredoxins] <=>
1.0 3-phenylpropanoyl-CoA + 2.0 [Reduced-ferredoxins] + 2.0 NAD+
tyr-red/1_1.1.1.222_1.1.1.222-RXN_WOP : 1.0 NADH + 1.0 4-hydroxyphenylpyruvate + 1.0 H+ <=> 1.0
(R)-3-(4-hydroxyphenyl)lactate + 1.0 NAD+
tyr-red/2_manual_2.8.3.-_HD-2.8.3.-tyr : 1.0 (R)-(4-hydroxyphenyl)lactoyl-CoA + 1.0 3-(4-hydroxyphenyl)propanoate
<=> 1.0 3-(4-hydroxyphenyl)propanoyl-CoA + 1.0 (R)-3-(4-hydroxyphenyl)lactate
tyr-red/3_manual_4.2.1.-_HD-4.2.1.-tyr : 1.0 (R)-(4-hydroxyphenyl)lactoyl-CoA -> 1.0
3-(4-hydroxyphenyl)acryloyl-CoA + 1.0 H2O
tyr-red/4_manual_1.3.98.-_HD-1.3.98.-tyr : 1.0 3-(4-hydroxyphenyl)acryloyl-CoA + 2.0 NADH + 2.0
[Oxidized-ferredoxins] <=> 1.0 3-(4-hydroxyphenyl)propanoyl-CoA + 2.0 [Reduced-ferredoxins] + 2.0 NAD+
##### valine biosyn #####
valine-biosyn/1_2.2.1.6_RXN-12583 : 1.0 thiamine_diphosphate + 1.0 pyruvate + 1.0 H+ -> 1.0
2-(alpha-hydroxyethyl)thiamine_diphosphate + 1.0 CO2
valine-biosyn/2_2.2.1.6_RXN-14037 : 1.0 (S)-2-acetolactate + 1.0 thiamine_diphosphate <=> 1.0
2-(alpha-hydroxyethyl)thiamine_diphosphate + 1.0 pyruvate
valine-biosyn/3_1.1.1.86_RXN-16061 : 1.0 NADP+ + 1.0 (2R)-2,3-dihydroxy-3-methylbutanoate <=> 1.0 H+ + 1.0
(S)-2-acetolactate + 1.0 NADPH
valine-biosyn/4_4.2.1.9_DIHYDROXYISOVALDEHYDRAT-RXN : 1.0 (2R)-2,3-dihydroxy-3-methylbutanoate -> 1.0 H2O + 1.0
3-methyl-2-oxobutanoate
valine-biosyn/5_2.6.1.42_BRANCHED-CHAINAMINOTRANSFERVAL-RXN : 1.0 2-oxoglutarate + 1.0 L-valine <=> 1.0
3-methyl-2-oxobutanoate + 1.0 L-glutamate
##### leucine biosyn #####
leucine-biosyn/1_2.3.3.13_2-ISOPROPYLMALATESYN-RXN : 1.0 H2O + 1.0 acetyl-CoA + 1.0 3-methyl-2-oxobutanoate -> 1.0
H+ + 1.0 coenzyme_A + 1.0 (2S)-2-isopropylmalate
leucine-biosyn/2_4.2.1.33_RXN-13163 : 1.0 (2R,3S)-3-isopropylmalate <=> 1.0 (2S)-2-isopropylmalate
leucine-biosyn/3_1.1.1.85_3-ISOPROPYLMALDEHYDROG-RXN : 1.0 NAD+ + 1.0 (2R,3S)-3-isopropylmalate <=> 1.0 H+ + 1.0
NADH + 1.0 (2S)-2-isopropyl-3-oxosuccinate
leucine-biosyn/4_spontaneous_1.1.1.85_RXN-7800 : 1.0 (2S)-2-isopropyl-3-oxosuccinate + 1.0 H+ -> 1.0
4-methyl-2-oxopentanoate + 1.0 CO2
leucine-biosyn/5_2.6.1.42_BRANCHED-CHAINAMINOTRANSFERLEU-RXN : 1.0 L-leucine + 1.0 2-oxoglutarate <=> 1.0
4-methyl-2-oxopentanoate + 1.0 L-glutamate
##### isoleucine biosyn #####

```



isoleucine-biosyn-II/1\_2.3.1.182\_RXN-7743 : 1.0 pyruvate + 1.0 acetyl-CoA + 1.0 H<sub>2</sub>O -> 1.0 H<sup>+</sup> + 1.0 (R)-citramalate + 1.0 coenzyme\_A  
isoleucine-biosyn-II/4\_2.1.1.35\_R-2-METHYLMALATE-DEHYDRATASE-RXN : 1.0 (R)-citramalate <=> 1.0 H<sub>2</sub>O + 1.0 citraconate  
isoleucine-biosyn-II/3\_4.2.1.35\_RXN-7744 : 1.0 citraconate + 1.0 H<sub>2</sub>O -> 1.0 (2R,3S)-3-methylmalate  
isoleucine-biosyn-II/4\_1.1.1.85\_RXN-7745 : 1.0 NAD<sup>+</sup> + 1.0 (2R,3S)-3-methylmalate -> 1.0 CO<sub>2</sub> + 1.0 2-oxobutanoate + 1.0 NADH  
isoleucine-biosyn-II/5\_2.2.1.6\_R04673 : 1.0 2-oxobutanoate + 1.0 2-(alpha-hydroxyethyl)thiamine\_diphosphate <=> 1.0 thiamine\_diphosphate + 1.0 (S)-2-aceto-2-hydroxybutanoate  
isoleucine-biosyn-II/6\_1.1.1.86\_ACETOHBUTREDUCTOISOM-RXN : 1.0 (R)-2,3-dihydroxy-3-methylpentanoate + 1.0 NADP<sup>+</sup> <- 1.0 NADPH + 1.0 (S)-2-aceto-2-hydroxybutanoate + 1.0 H<sup>+</sup>  
isoleucine-biosyn-II/7\_4.2.1.9\_DIHYDROXYMETVALDEHYDRAT-RXN : 1.0 (R)-2,3-dihydroxy-3-methylpentanoate -> 1.0 H<sub>2</sub>O + 1.0 (S)-3-methyl-2-oxopentanoate  
isoleucine-biosyn-II/8\_2.6.1.42\_BRANCHED-CHAINAMINOTRANSFERILEU-RXN : 1.0 L-isoleucine + 1.0 2-oxoglutarate <=> 1.0 (S)-3-methyl-2-oxopentanoate + 1.0 L-glutamate  
##### val/leu/ile degr ox #####  
valine-ox/1\_1.2.7.7\_1.2.7.7-RXN : 1.0 coenzyme\_A + 1.0 3-methyl-2-oxobutanoate + 2.0 [Oxidized-ferredoxins] -> 1.0 CO<sub>2</sub> + 2.0 [Reduced-ferredoxins] + 1.0 H<sup>+</sup> + 1.0 isobutanoyl-CoA  
leucine-ox/1\_manual\_1.2.7.7\_HD-1.2.7.7-leu : 1.0 4-methyl-2-oxopentanoate + 2.0 [Oxidized-ferredoxins] + 1.0 coenzyme\_A -> 1.0 isovaleryl-CoA + 1.0 CO<sub>2</sub> + 2.0 [Reduced-ferredoxins] + 1.0 H<sup>+</sup>  
isoleucine-ox/1\_manual\_1.2.7.7\_HD-1.2.7.7-ile : 1.0 (S)-3-methyl-2-oxopentanoate + 2.0 [Oxidized-ferredoxins] + 1.0 coenzyme\_A -> 1.0 2-methylbutanoyl-CoA + 1.0 CO<sub>2</sub> + 2.0 [Reduced-ferredoxins] + 1.0 H<sup>+</sup>  
valine-ox/2\_manual\_2.3.1.-\_HD-2.3.1.-val : 1.0 isobutanoyl-CoA + 1.0 phosphate -> 1.0 isobutyryl\_phosphate + 1.0 coenzyme\_A  
leucine-ox/2\_manual\_2.3.1.-\_HD-2.3.1.-leu : 1.0 isovaleryl-CoA + 1.0 phosphate -> 1.0 isovaleryl\_phosphate + 1.0 coenzyme\_A  
isoleucine-ox/2\_manual\_2.3.1.-\_HD-2.3.1.-ile : 1.0 2-methylbutanoyl-CoA + 1.0 phosphate -> 1.0 2-methylbutanoyl\_phosphate + 1.0 coenzyme\_A  
valine-ox/3\_manual\_2.7.2.-\_HD-2.7.2.-val : 1.0 isobutyryl\_phosphate + 1.0 ADP -> 1.0 isobutyrate + 1.0 ATP  
leucine-ox/3\_manual\_2.7.2.-\_HD-2.7.2.-leu : 1.0 isovaleryl\_phosphate + 1.0 ADP -> 1.0 isovalerate + 1.0 ATP  
isoleucine-ox/3\_manual\_2.7.2.-\_HD-2.7.2.-ile : 1.0 2-methylbutanoyl\_phosphate + 1.0 ADP -> 1.0 2-methylbutanoate + 1.0 ATP  
##### leu degr red #####  
leu-red/1\_manual\_1.1.1.345\_HD-1.1.1.345 : 1.0 D-2-hydroxyisocaproate + 1.0 NAD<sup>+</sup> <- 1.0 4-methyl-2-oxopentanoate + 1.0 H<sup>+</sup> + 1.0 NADH  
leu-red/2a\_manual\_2.8.3.-\_HD-2.8.3.-leu-A : 1.0 D-2-hydroxyisocaproyl-CoA + 1.0 isocaproate <=> 1.0 isocaproyl-CoA + 1.0 D-2-hydroxyisocaproate  
leu-red/3\_manual\_4.2.1.-\_HD-4.2.1.-leu : 1.0 D-2-hydroxyisocaproyl-CoA -> 1.0 2-isocaprenoyl-CoA + 1.0 H<sub>2</sub>O  
leu-red/4\_manual\_1.3.98.-\_HD-1.3.98.-leu : 1.0 2-isocaprenoyl-CoA + 2.0 NADH + 2.0 [Oxidized-ferredoxins] <=> 1.0 isocaproyl-CoA + 2.0 [Reduced-ferredoxins] + 2.0 NAD<sup>+</sup>  
# for the fatty acids  
leu-red/2b\_manual\_2.8.3.-\_HD-2.8.3.-leu-B : 1.0 D-2-hydroxyisocaproyl-CoA + 1.0 acetate <=> 1.0 acetyl-CoA + 1.0 D-2-hydroxyisocaproate  
leu-red/5\_manual\_2.3.1.-\_HD-2.3.1.-leu-red : 1.0 isocaproyl-CoA + 1.0 phosphate -> 1.0 isocaproyl\_phosphate + 1.0 coenzyme\_A  
##### pyruvate decarbox. #####  
formate\_2.3.1.54\_PYRUVFORMLY-RXN : 1.0 formate + 1.0 acetyl-CoA <=> 1.0 coenzyme\_A + 1.0 pyruvate  
formate\_2.3.1.54\_KETOBUTFORMLY-RXN : 1.0 coenzyme\_A + 1.0 2-oxobutanoate -> 1.0 formate + 1.0 propanoyl-CoA  
##### ferm. EtOH/PropOH/ButOH: #####  
ferm-EtOH/1\_1.2.1.10\_ACETALD-DEHYDROG-RXN : 1.0 NAD<sup>+</sup> + 1.0 coenzyme\_A + 1.0 acetaldehyde <=> 1.0 acetyl-CoA + 1.0 H<sup>+</sup> + 1.0 NADH  
ferm-EtOH/2\_1.1.1.1\_ALCOHOL-DEHYDROGENASE-NADP+-RXN\_WOP : 1.0 ethanol + 1.0 NAD<sup>+</sup> <=> 1.0 H<sup>+</sup> + 1.0 NADH + 1.0 acetaldehyde  
ferm-PropOH/1\_1.2.1.87\_RXN-12736 : 1.0 coenzyme\_A + 1.0 NAD<sup>+</sup> + 1.0 propanal <=> 1.0 NADH + 1.0 H<sup>+</sup> + 1.0 propanoyl-CoA  
ferm-PropOH/2\_1.1.1.1\_RXN-13198 : 1.0 n-propanol + 1.0 NAD<sup>+</sup> <=> 1.0 H<sup>+</sup> + 1.0 propanal + 1.0 NADH  
ferm-ButOH/1\_1.2.1.10\_1.2.1.87\_BUTANAL-DEHYDROGENASE-RXN\_WOP : 1.0 butanal + 1.0 coenzyme\_A + 1.0 NAD<sup>+</sup> <=> 1.0 butanoyl-CoA + 1.0 NADH + 1.0 H<sup>+</sup>  
ferm-ButOH/2\_1.1.1.-\_RXN-161 : 1.0 n-butanol + 1.0 NAD<sup>+</sup> <- 1.0 NADH + 1.0 butanal + 1.0 H<sup>+</sup>  
ferm-IbutOH/1\_1.2.1.10\_RXN-13671 : 1.0 NAD<sup>+</sup> + 1.0 coenzyme\_A + 1.0 isobutanal <=> 1.0 H<sup>+</sup> + 1.0 NADH + 1.0 isobutanoyl-CoA  
ferm-IbutOH/2\_1.1.1.1\_RXN-7657 : 1.0 NAD<sup>+</sup> + 1.0 isobutanol <=> 1.0 NADH + 1.0 isobutanal + 1.0 H<sup>+</sup>  
##### ferm acetate/propanoate #####  
ferm-acetate/1\_1.2.7.1\_PYRUFVREDUCT-RXN : 1.0 coenzyme\_A + 1.0 pyruvate + 2.0 [Oxidized-ferredoxins] <=> 1.0 acetyl-CoA + 2.0 [Reduced-ferredoxins] + 1.0 H<sup>+</sup> + 1.0 CO<sub>2</sub>  
ferm-acetate/2\_2.3.1.8\_PHOSACETYLTRANS-RXN : 1.0 acetyl-CoA + 1.0 phosphate <=> 1.0 acetyl\_phosphate + 1.0 coenzyme\_A  
ferm-acetate/3\_2.7.2.1\_moddir\_ACETATEKIN-RXN : 1.0 ATP + 1.0 acetate <=> 1.0 acetyl\_phosphate + 1.0 ADP  
ferm-propanoate/1\_1.2.7.1\_2-OXOBUTYRATE-SYNTHASE-RXN : 1.0 2-oxobutanoate + 1.0 coenzyme\_A + 2.0

## Anhang

---

```
[Oxidized-ferredoxins] <=> 1.0 H+ + 1.0 propanoyl-CoA + 1.0 CO2 + 2.0 [Reduced-ferredoxins]
ferm-propanoate/2_2.3.1.222_2.3.1.8_PTAALT-RXN : 1.0 phosphate + 1.0 propanoyl-CoA <=> 1.0 coenzyme_A + 1.0
propanoyl_phosphate
ferm-propanoate/3_2.7.2.1_moddir_PROPIN-RXN : 1.0 propanoate + 1.0 ATP <=> 1.0 ADP + 1.0 propanoyl_phosphate
##### 6.2.1.13 #####
# Homolog to previously characterized Isoenzyme I of Archaeoglobus fulgidus [40]
acetyl-CoA-to-acid_6.2.1.13_ACETATE-COA-LIGASE-ADP-FORMING-RXN : 1.0 ATP + 1.0 coenzyme_A + 1.0 acetate <=> 1.0
ADP + 1.0 acetyl-CoA + 1.0 phosphate
propanoyl-CoA-to-acid_6.2.1.13_PROPANOATECOA-LIGASE-RXN : 1.0 propanoate + 1.0 coenzyme_A + 1.0 ATP <=> 1.0
propanoyl-CoA + 1.0 phosphate + 1.0 ADP
butanoyl-CoA-to-acid_manual_6.2.1.13_HD-6.2.1.13 : 1.0 ATP + 1.0 coenzyme_A + 1.0 butanoate <=> 1.0 ADP + 1.0
butanoyl-CoA + 1.0 phosphate
##### fermentation to propanoate C (stickland-reductive-like) #####
propanoate-ferm/1a_2.8.3.-_PROPIONLACT-RXN : 1.0 propanoyl-CoA + 1.0 (S)-lactate <=> 1.0 (S)-lactoyl-CoA + 1.0
propanoate
propanoate-ferm/2a_4.2.1.54_RXN-781 : 1.0 (S)-lactoyl-CoA <=> 1.0 H2O + 1.0 acryloyl-CoA
propanoate-ferm/1b_2.8.3.-_LACCOA-RXN : 1.0 propanoyl-CoA + 1.0 (R)-lactate <=> 1.0 (R)-lactoyl-CoA + 1.0
propanoate
propanoate-ferm/2b_4.2.1.54_LACTOYL-COA-DEHYDRATASE-RXN : 1.0 (R)-lactoyl-CoA <=> 1.0 acryloyl-CoA + 1.0 H2O
propanoate-ferm/3_manual_1.3.98.-_HD-1.3.98.-prop : 1.0 acryloyl-CoA + 2.0 NADH + 2.0 [Oxidized-ferredoxins] ->
1.0 propanoyl-CoA + 2.0 [Reduced-ferredoxins] + 2.0 NAD+
# propanoate-ferm/3_1.3.1.95_RXN-8568 : 1.0 acryloyl-CoA + 1.0 NADH + 1.0 H+ -> 1.0 propanoyl-CoA + 1.0 NAD+ #
source: MetaCyc, BRENDA, KEGG (queried 1.3.1.95)
##### lactate metabolism #####
# Both lactate dehydrogenases irreversible to prevent cycles
pyruvate-ferm-to-lactate_moddir_1.1.1.27_L-LACTATE-DEHYDROGENASE-RXN : 1.0 (S)-lactate + 1.0 NAD+ <- 1.0 H+ + 1.0
NADH + 1.0 pyruvate
lactate-recemation_5.1.2.1_LACTATE-RACEMASE-RXN : 1.0 (S)-lactate <=> 1.0 (R)-lactate
lactate-oxidation_manual_1.1.98.-_HD-1.1.98.-pyr : 1.0 pyruvate + 2.0 NADH + 2.0 [Oxidized-ferredoxins] <- 1.0
(R)-lactate + 2.0 [Reduced-ferredoxins] + 2.0 NAD+
##### ferm. butanoate/butyrate #####
succinate-to-butyrate/1_2.8.3.18_RXN-8807 : 1.0 acetate + 1.0 succinyl-CoA <=> 1.0 acetyl-CoA + 1.0 succinate
succinate-to-butyrate/2_1.2.1.76_RXN-8891 : 1.0 succinate_semialdehyde + 1.0 NADP+ + 1.0 coenzyme_A <- 1.0
succinyl-CoA + 1.0 H+ + 1.0 NADPH
succinate-to-butyrate/3_1.1.1.61_RXN-6903_WOP : 1.0 NAD+ + 1.0 4-hydroxybutanoate <=> 1.0 H+ + 1.0 NADH + 1.0
succinate_semialdehyde
succinate-to-butyrate/4a_2.8.3.-_RXN-8889 : 1.0 acetyl-CoA + 1.0 4-hydroxybutanoate -> 1.0 4-hydroxybutanoyl-CoA +
1.0 acetate
succinate-to-butyrate/4b_manual_2.8.3.-_HD-4hbut : 1.0 4-hydroxybutanoate + 1.0 butanoyl-CoA -> 1.0
4-hydroxybutanoyl-CoA + 1.0 butanoate
succinate-to-butyrate/5a_4.2.1.120_RXN-8890 : 1.0 4-hydroxybutanoyl-CoA <=> 1.0 H2O + 1.0 crotonyl-CoA
succinate-to-butyrate/5b_moddir_4.2.1.120_BS403853 : 1.0 4-hydroxybutanoyl-CoA <=> 1.0 vinylacetyl-CoA + 1.0 H2O
succinate-to-butyrate/6_5.3.3.3_VINYLACETYL-COA-DELTA-ISOMERASE-RXN : 1.0 vinylacetyl-CoA <=> 1.0 crotonyl-CoA
acetyl-CoA-to-butyrate-II/1_2.3.1.9_ACETYL-COA-ACETYLTRANSFER-RXN : 2.0 acetyl-CoA <=> 1.0 acetoacetyl-CoA + 1.0
coenzyme_A
# The enzyme of C. difficile uses NADH [41]
acetyl-CoA-to-butyrate-II/2_1.1.1.35_HD-1.1.1.35 : 1.0 (S)-3-hydroxybutanoyl-CoA + 1.0 NAD+ <- 1.0 acetoacetyl-CoA
+ 1.0 NADH + 1.0 H+
acetyl-CoA-to-butyrate-II/3_4.2.1.150_RXN-11667 : 1.0 (S)-3-hydroxybutanoyl-CoA <=> 1.0 crotonyl-CoA + 1.0 H2O
crotonyl-CoA-to-butanoyl/1_manual_1.3.98.-_HD-1.3.98.-but : 1.0 crotonyl-CoA + 2.0 NADH + 2.0
[Oxidized-ferredoxins] <=> 1.0 butanoyl-CoA + 2.0 [Reduced-ferredoxins] + 2.0 NAD+
crotonyl-CoA-to-butanoyl/2_2.3.1.19_PHOSPHATE-BUTYRYLTRANSFERASE-RXN : 1.0 phosphate + 1.0 butanoyl-CoA <=> 1.0
coenzyme_A + 1.0 butanoyl_phosphate
crotonyl-CoA-to-butanoyl/3_moddir_2.7.2.7_BUTYRATE-KINASE-RXN : 1.0 butanoate + 1.0 ATP <=> 1.0 ADP + 1.0
butanoyl_phosphate
(R)-3-hydroxybutanoate-ferm/1a_2.8.3.9_2.8.3.9-RXN : 1.0 acetoacetate + 1.0 butanoyl-CoA <=> 1.0 acetoacetyl-CoA +
1.0 butanoate
(R)-3-hydroxybutanoate-ferm/1b_2.8.3.9_ACETOACETYL-COA-TRANSFER-RXN : 1.0 acetyl-CoA + 1.0 acetoacetate <=> 1.0
acetoacetyl-CoA + 1.0 acetate
(R)-3-hydroxybutanoate-ferm/2_1.1.1.30_3-HYDROXYBUTYRATE-DEHYDROGENASE-RXN : 1.0 (R)-3-hydroxybutanoate + 1.0 NAD+
<=> 1.0 NADH + 1.0 acetoacetate + 1.0 H+
# spontaneous [42]
acetone-fermentation_spontaneous_ACETOACETATE-DECARBOXYLASE-RXN : 1.0 acetoacetate + 1.0 H+ -> 1.0 acetone + 1.0
CO2
acetone-fermentation-ex_spontaneous_ACETOACETATE-DECARBOXYLASE-RXN : 1.0 acetoacetate[ex] + 1.0 H+[ex] -> 1.0
acetone[ex] + 1.0 CO2[ex]
##### ferm. pentanoate #####
pentanoate-ferm/1_2.3.1.9_RXN-12561 : 1.0 acetyl-CoA + 1.0 propanoyl-CoA <=> 1.0 coenzyme_A + 1.0
beta-ketoaleryl-CoA
```

```

pentanoate-ferm/2_manual_1.1.1.157_HD-1.1.1.157-pent : 1.0 (R)-3-hydroxypentanoyl-CoA + 1.0 NAD+ <- 1.0 H+ + 1.0
NADH + 1.0 beta-ketovaleryl-CoA
pentanoate-ferm/3_manual_4.2.1.150_HD-4.2.1.150-pent : 1.0 (R)-3-hydroxypentanoyl-CoA -> 1.0 2-pentenoyl-CoA + 1.0
H2O
pentanoate-ferm/4_manual_1.3.98.-_HD-1.3.98.-pent : 1.0 2-pentenoyl-CoA + 2.0 NADH + 2.0 [Oxidized-ferredoxins]
<=> 1.0 pentanoyl-CoA + 2.0 [Reduced-ferredoxins] + 2.0 NAD+
pentanoate-ferm/5_manual_2.3.1.19_HD-2.3.1.19-pent : 1.0 pentanoyl-CoA + 1.0 phosphate -> 1.0 pentanoyl_phosphate +
1.0 coenzyme_A
pentanoate-ferm/6_manual_2.7.2.7_HD-2.7.2.7-pent : 1.0 pentanoyl_phosphate + 1.0 ADP -> 1.0 pentanoate + 1.0 ATP
##### ferm. hexanoate #####
hexanoate-ferm/1_2.3.1.9_RXN-12565 : 1.0 acetyl-CoA + 1.0 butanoyl-CoA -> 1.0 coenzyme_A + 1.0 3-oxohexanoyl-CoA
hexanoate-ferm/2_manual_1.1.1.157_HD-1.1.1.157-hex : 1.0 (R)-3-hydroxyhexanoyl-CoA + 1.0 NAD+ <- 1.0 H+ + 1.0 NADH
+ 1.0 3-oxohexanoyl-CoA
hexanoate-ferm/3_manual_4.2.1.150_HD-4.2.1.150-hex : 1.0 (R)-3-hydroxyhexanoyl-CoA -> 1.0 2-hexenoyl-CoA + 1.0 H2O
hexanoate-ferm/4_manual_1.3.98.-_HD-1.3.98.-hex : 1.0 2-hexenoyl-CoA + 2.0 NADH + 2.0 [Oxidized-ferredoxins] <=>
1.0 hexanoyl-CoA + 2.0 [Reduced-ferredoxins] + 2.0 NAD+
hexanoate-ferm/5_manual_2.3.1.19_HD-2.3.1.19-hex : 1.0 hexanoyl-CoA + 1.0 phosphate -> 1.0 hexanoyl_phosphate +
1.0 coenzyme_A
hexanoate-ferm/6_manual_2.7.2.7_HD-2.7.2.7-hex : 1.0 hexanoyl_phosphate + 1.0 ADP -> 1.0 hexanoate + 1.0 ATP
##### 5-aminoimidazole ribonucleotide biosynthesis II #####
5-aminoimidazole-ribonucleotide-biosyn-II/1_2.4.2.14_PRPPAMIDOTRANS-RXN : 1.0 diphosphate + 1.0 L-glutamate + 1.0
5-phospho-beta-D-ribosylamine <=> 1.0 L-glutamine + 1.0 H2O + 1.0 5-phospho-alpha-D-ribose_1-diphosphate
5-aminoimidazole-ribonucleotide-biosyn-II/2_6.3.4.13_GLYRIBONUCSYN-RXN : 1.0 glycine + 1.0 ATP + 1.0
5-phospho-beta-D-ribosylamine -> 1.0 H+ + 1.0 phosphate + 1.0 ADP + 1.0 N1-(5-phospho-beta-D-ribosyl)glycinamide
5-aminoimidazole-ribonucleotide-biosyn-II/3_2.1.2.2_GART-RXN : 1.0 10-formyltetrahydrofolate
+ 1.0 N1-(5-phospho-beta-D-ribosyl)glycinamide <=> 1.0 tetrahydropteroyl_tri-L-glutamate + 1.0
N2-formyl-N1-(5-phospho-beta-D-ribosyl)glycinamide + 1.0 H+
5-aminoimidazole-ribonucleotide-biosyn-II/4_6.3.5.3_FGAMSYN-RXN : 1.0 H2O + 1.0 L-glutamine
+ 1.0 ATP + 1.0 N2-formyl-N1-(5-phospho-beta-D-ribosyl)glycinamide -> 1.0 ADP + 1.0
2-(formamido)-N1-(5-phospho-beta-D-ribosyl)acetamidine + 1.0 H+ + 1.0 phosphate + 1.0 L-glutamate
5-aminoimidazole-ribonucleotide-biosyn-II/5_6.3.3.1_AIRS-RXN : 1.0 ATP + 1.0
2-(formamido)-N1-(5-phospho-beta-D-ribosyl)acetamidine -> 1.0 phosphate + 1.0 ADP + 1.0
5-amino-1-(5-phospho-beta-D-ribosyl)imidazole + 1.0 H+
##### inosine-5'-phosphate biosynthesis #####
# E. coli class I 5.4.99.18 (PurE) without 6.3.4.18 (PurK) sufficient in vitro under high bicarbonate
concentrations [43].
# Overexpression of purE complements purK deletion in E. coli [44].
# Several archaea with class I 5.4.99.18 (PurE) and missing purK found [45]
inosine-5'-phosphate-biosyn/1_manual_spontaneous_5.4.99.18_HD-5.4.99.18 : 1.0 hydrogen_carbonate + 1.0
5-amino-1-(5-phospho-beta-D-ribosyl)imidazole -> 1.0 H+ + 1.0 N5-carboxyaminoimidazole-ribonucleotide
inosine-5'-phosphate-biosyn/2_5.4.99.18_RXN0-743 : 1.0 N5-carboxyaminoimidazole-ribonucleotide -> 1.0
5-amino-1-(5-phospho-D-ribosyl)imidazole-4-carboxylate
inosine-5'-phosphate-biosyn/3_6.3.2.6_SAICARSYN-RXN : 1.0 5-amino-1-(5-phospho-D-ribosyl)imidazole-4-carboxylate +
1.0 L-aspartate + 1.0 ATP -> 1.0 5'-phosphoribosyl-4-(N-succinocarboxamide)-5-aminoimidazole + 1.0 ADP + 1.0 H+ +
1.0 phosphate
inosine-5'-phosphate-biosyn/4_4.3.2.2_AICARSYN-RXN : 1.0 5'-phosphoribosyl-4-(N-succinocarboxamide)-5-
aminoimidazole <=> 1.0 5-amino-1-(5-phospho-D-ribosyl)imidazole-4-carboxamide + 1.0 fumarate
inosine-5'-phosphate-biosyn/5_2.1.2.3_AICARTRANSFORM-RXN : 1.0 10-formyltetrahydrofolate + 1.0
5-amino-1-(5-phospho-D-ribosyl)imidazole-4-carboxamide <=> 1.0 tetrahydropteroyl_tri-L-glutamate + 1.0
5-formamido-1-(5-phospho-D-ribosyl)-imidazole-4-carboxamide
inosine-5'-phosphate-biosyn/6_moddir_3.5.4.10_2.1.2.3_IMPCYCLOHYDROLASE-RXN : 1.0 H2O + 1.0 IMP <=> 1.0
5-formamido-1-(5-phospho-D-ribosyl)-imidazole-4-carboxamide
##### tRNA #####
tRNA-charging_6.1.1.10_METHIONINE-TRNA-LIGASE-RXN : 1.0 ATP + 1.0 [MET-tRNAs] + 1.0 H+ + 1.0 L-methionine -> 1.0
[Charged-MET-tRNAs] + 1.0 diphosphate + 1.0 AMP
tRNA-charging_6.1.1.11_SERINE-TRNA-LIGASE-RXN : 1.0 H+ + 1.0 ATP + 1.0 [SER-tRNAs] + 1.0 L-serine -> 1.0
[Charged-SER-tRNAs] + 1.0 diphosphate + 1.0 AMP
tRNA-charging_6.1.1.12_ASPARTATE-TRNA-LIGASE-RXN : 1.0 [ASP-tRNAs] + 1.0 H+ + 1.0 L-aspartate + 1.0 ATP -> 1.0
[Charged-ASP-tRNAs] + 1.0 diphosphate + 1.0 AMP
tRNA-charging_6.1.1.14_GLYCINE-TRNA-LIGASE-RXN : 1.0 [GLY-tRNAs] + 1.0 H+ + 1.0 glycine + 1.0 ATP -> 1.0
[Charged-GLY-tRNAs] + 1.0 diphosphate + 1.0 AMP
tRNA-charging_6.1.1.15_PROLINE-TRNA-LIGASE-RXN : 1.0 ATP + 1.0 L-proline + 1.0 [PRO-tRNAs] + 1.0 H+ -> 1.0
[Charged-PRO-tRNAs] + 1.0 diphosphate + 1.0 AMP
tRNA-charging_6.1.1.16_CYSSTEINE-TRNA-LIGASE-RXN : 1.0 [CYS-tRNAs] + 1.0 H+ + 1.0 L-cysteine + 1.0 ATP -> 1.0 AMP +
1.0 [Charged-CYS-tRNAs] + 1.0 diphosphate
tRNA-charging_6.1.1.17_GLUTAMINE-TRNA-LIGASE-RXN : 1.0 [GLT-tRNAs] + 1.0 H+ + 1.0 L-glutamate + 1.0 ATP -> 1.0 [Charged-GLT-tRNAs]
+ 1.0 AMP + 1.0 diphosphate
tRNA-charging_6.1.1.18_GLUTAMINE-TRNA-LIGASE-RXN : 1.0 H+ + 1.0 L-glutamine + 1.0 ATP + 1.0 [GLN-tRNAs] -> 1.0
[Charged-GLN-tRNAs] + 1.0 diphosphate + 1.0 AMP

```

tRNA-charging\_6.1.1.19\_ARGININE-TRNA-LIGASE-RXN : 1.0 L-arginine + 1.0 |ARG-tRNAs| + 1.0 H+ + 1.0 ATP -> 1.0  
|Charged-ARG-tRNAs| + 1.0 diphosphate + 1.0 AMP  
tRNA-charging\_6.1.1.1\_TYROSINE-TRNA-LIGASE-RXN : 1.0 ATP + 1.0 |TYR-tRNAs| + 1.0 L-tyrosine + 1.0 H+ -> 1.0  
|Charged-TYR-tRNAs| + 1.0 diphosphate + 1.0 AMP  
tRNA-charging\_6.1.1.20\_PHENYLALANINE-TRNA-LIGASE-RXN : 1.0 H+ + 1.0 L-phenylalanine + 1.0 ATP + 1.0 |PHE-tRNAs| ->  
1.0 |Charged-PHE-tRNAs| + 1.0 AMP + 1.0 diphosphate  
tRNA-charging\_6.1.1.21\_HISTIDINE-TRNA-LIGASE-RXN : 1.0 |HIS-tRNAs| + 1.0 H+ + 1.0 L-histidine + 1.0 ATP -> 1.0  
|Charged-HIS-tRNAs| + 1.0 diphosphate + 1.0 AMP  
tRNA-charging\_6.1.1.22\_ASPARAGINE-TRNA-LIGASE-RXN : 1.0 |ASN-tRNAs| + 1.0 H+ + 1.0 ATP + 1.0 L-asparagine -> 1.0  
|Charged-ASN-tRNAs| + 1.0 diphosphate + 1.0 AMP  
tRNA-charging\_6.1.1.2\_TRYPTOPHAN-TRNA-LIGASE-RXN : 1.0 ATP + 1.0 |TRP-tRNAs| + 1.0 L-tryptophan + 1.0 H+ -> 1.0  
|Charged-TRP-tRNAs| + 1.0 diphosphate + 1.0 AMP  
tRNA-charging\_6.1.1.3\_THREONINE-TRNA-LIGASE-RXN : 1.0 |THR-tRNAs| + 1.0 L-threonine + 1.0 H+ + 1.0 ATP -> 1.0  
|Charged-THR-tRNAs| + 1.0 diphosphate + 1.0 AMP  
tRNA-charging\_6.1.1.4\_LEUCINE-TRNA-LIGASE-RXN : 1.0 ATP + 1.0 |LEU-tRNAs| + 1.0 H+ + 1.0 L-leucine -> 1.0  
|Charged-LEU-tRNAs| + 1.0 diphosphate + 1.0 AMP  
tRNA-charging\_6.1.1.5\_ISOLEUCINE-TRNA-LIGASE-RXN : 1.0 ATP + 1.0 |ILE-tRNAs| + 1.0 H+ + 1.0 L-isoleucine -> 1.0  
|Charged-ILE-tRNAs| + 1.0 AMP + 1.0 diphosphate  
tRNA-charging\_6.1.1.6\_LYSINE-TRNA-LIGASE-RXN : 1.0 ATP + 1.0 |LYS-tRNAs| + 1.0 H+ + 1.0 L-lysine -> 1.0  
|Charged-LYS-tRNAs| + 1.0 diphosphate + 1.0 AMP  
tRNA-charging\_6.1.1.7\_ALANINE-TRNA-LIGASE-RXN : 1.0 H+ + 1.0 |ALA-tRNAs| + 1.0 L-alanine + 1.0 ATP -> 1.0 AMP +  
1.0 |Charged-ALA-tRNAs| + 1.0 diphosphate  
tRNA-charging\_6.1.1.9\_VALINE-TRNA-LIGASE-RXN : 1.0 H+ + 1.0 ATP + 1.0 |VAL-tRNAs| + 1.0 L-valine -> 1.0  
|Charged-VAL-tRNAs| + 1.0 diphosphate + 1.0 AMP  
selenocysteine-biosynthesis\_6.1.1.11\_RXNO-2161 : 1.0 |SEC-tRNAs| + 1.0 L-serine + 1.0 H+ + 1.0 ATP -> 1.0 AMP +  
1.0 |L-seryl-SEC-tRNAs| + 1.0 diphosphate  
##### NAD biosyn I/NADP #####  
NAD-biosyn-I/1a\_1.4.3.16\_L-ASPARTATE-OXID-RXN : 1.0 oxygen + 1.0 L-aspartate -> 1.0 2-iminosuccinate + 1.0  
hydrogen\_peroxide + 1.0 H+  
NAD-biosyn-I/1b\_1.4.3.16\_RXN-9772 : 1.0 L-aspartate + 1.0 fumarate -> 1.0 2-iminosuccinate + 1.0 H+ + 1.0  
succinate  
NAD-biosyn-I/2\_2.5.1.72\_QUINOLINATE-SYNTHA-RXN : 1.0 2-iminosuccinate + 1.0 glycerone\_phosphate -> 1.0 quinolinate  
+ 1.0 phosphate + 2.0 H2O  
NAD-biosyn-I/3\_2.4.2.19\_QUINOPRIBOTRANS-RXN : 1.0 diphosphate + 1.0 beta-nicotinate\_D-ribonucleotide + 1.0 CO2 <=  
1.0 5-phospho-alpha-D-ribose\_1-diphosphate + 2.0 H+ + 1.0 quinolinate  
NAD-biosyn-I/4\_2.7.7.18\_NICONUCADENYLTRAN-RXN : 1.0 beta-nicotinate\_D-ribonucleotide + 1.0 H+ + 1.0 ATP -> 1.0  
nicotinate\_adenine\_dinucleotide + 1.0 diphosphate  
NAD-biosyn-I/5\_6.3.1.5\_NAD-SYNTH-NH3-RXN : 1.0 ATP + 1.0 ammonium + 1.0 nicotinate\_adenine\_dinucleotide -> 1.0 NAD+  
+ 1.0 AMP + 1.0 H+ + 1.0 diphosphate  
NADP-biosyn\_2.7.1.23\_NAD-KIN-RXN : 1.0 NAD+ + 1.0 ATP -> 1.0 ADP + 1.0 NADP+ + 1.0 H+  
##### NADH repair #####  
NADH-repair\_spontaneous\_RXN-12753 : 1.0 NADH + 1.0 H2O -> 1.0 (S)-NADHX  
NADH-repair\_spontaneous\_RXN-12754 : 1.0 H2O + 1.0 NADH -> 1.0 (R)-NADHX  
NADH-repair\_5.1.99.6\_RXN-12752 : 1.0 (R)-NADHX -> 1.0 (S)-NADHX  
NADH-repair\_4.2.1.136\_RXNO-6727 : 1.0 (S)-NADHX + 1.0 ADP -> 1.0 H+ + 1.0 phosphate + 1.0 NADH + 1.0 AMP  
NADPH-repair\_manual\_spontaneous\_HD-(S)-NADPHX : 1.0 NADPH + 1.0 H2O -> 1.0 (S)-NADPHX  
NADPH-repair\_manual\_spontaneous\_HD-(R)-NADPHX : 1.0 H2O + 1.0 NADPH -> 1.0 (R)-NADPHX  
NADPH-repair\_5.1.99.6\_RXN-13142 : 1.0 (R)-NADPHX <=> 1.0 (S)-NADPHX  
NADPH-repair\_4.2.1.136\_RXN-13141 : 1.0 (S)-NADPHX + 1.0 ADP -> 1.0 NADPH + 1.0 AMP + 1.0 H+ + 1.0 phosphate  
##### nicotine transitions #####  
nicotine-transitions-A/1\_3.1.3.5\_RXN-14227 : 1.0 beta-nicotinate\_D-ribonucleotide + 1.0 H2O -> 1.0  
beta-D-ribosylnicotinate + 1.0 phosphate  
nicotine-transitions-A/2\_2.4.2.1\_R02295 : 1.0 phosphate + 1.0 beta-D-ribosylnicotinate <=> 1.0  
alpha-D-ribose-1-phosphate + 1.0 nicotinate  
nicotine-transitions-B\_3.6.1.9\_BS165396 : 1.0 nicotinate\_adenine\_dinucleotide + 1.0 H2O -> 1.0 AMP + 1.0  
beta-nicotinate\_D-ribonucleotide  
nicotine-transitions-C/1\_3.6.1.9\_NADPYROPHOSPHAT-RXN : 1.0 H2O + 1.0 NAD+ -> 2.0 H+ + 1.0  
beta-nicotinamide\_D-ribonucleotide + 1.0 AMP  
nicotine-transitions-C/2\_3.1.3.5\_3.1.3.2\_RXN-5841 : 1.0 H2O + 1.0 beta-nicotinamide\_D-ribonucleotide -> 1.0  
1-(beta-D-ribofuranosyl)nicotinamide + 1.0 phosphate  
nicotine-transitions-C/3\_3.2.2.1\_BS94861 : 1.0 1-(beta-D-ribofuranosyl)nicotinamide + 1.0 H2O -> 1.0 nicotinamide +  
1.0 beta-D-ribofuranose  
nicotine-transitions-C/4a\_3.5.1.19\_NICOTINAMID-RXN : 1.0 H2O + 1.0 nicotinamide -> 1.0 ammonium + 1.0 nicotinate  
nicotine-transitions-C/4b\_2.4.2.1\_RXNO-7092 : 1.0 alpha-D-ribose-1-phosphate + 1.0 H+ + 1.0 nicotinamide <=> 1.0  
phosphate + 1.0 1-(beta-D-ribofuranosyl)nicotinamide  
nicotine-transitions-C/5\_2.7.7.18\_2.7.7.1-RXN : 1.0 H+ + 1.0 beta-nicotinamide\_D-ribonucleotide + 1.0 ATP -> 1.0  
diphosphate + 1.0 NAD+  
##### FAD biosyn I #####  
flavin-biosyn-I/1\_3.5.4.25\_GTP-CYCLOHYDRO-II-RXN : 3.0 H2O + 1.0 GTP -> 1.0 diphosphate + 1.0 formate + 1.0

2,5-diamino-6-(5-phospho-D-ribosylamino)pyrimidin-4(3H)-one + 2.0 H+

flavin-biosyn-I/2\_3.5.4.26\_RIBOFLAVINSYNDEAM-RXN : 1.0 2,5-diamino-6-(5-phospho-D-ribosylamino)pyrimidin-4(3H)-one + 1.0 H+ + 1.0 H2O -> 1.0 ammonium + 1.0 5-amino-6-(5-phospho-D-ribosylamino)uracil

flavin-biosyn-I/3\_1.1.1.193\_RIBOFLAVINSYNREDUC-RXN : 1.0 NADP+ + 1.0 5-amino-6-(5-phospho-D-ribitylamino)uracil <- 1.0 H+ + 1.0 5-amino-6-(5-phospho-D-ribosylamino)uracil + 1.0 NADPH

flavin-biosyn-I/4\_3.1.3.-\_RIBOPHOSPHAT-RXN : 1.0 H2O + 1.0 5-amino-6-(5-phospho-D-ribitylamino)uracil -> 1.0 5-amino-6-(D-ribitylamino)uracil + 1.0 phosphate

flavin-biosyn-I/5\_4.1.99.12\_DIOHBUTANONEPSYN-RXN : 1.0 D-ribulose\_5-phosphate -> 1.0 H+ + 1.0 1-deoxy-L-glycero-tetrol\_4-phosphate + 1.0 formate

flavin-biosyn-I/6\_2.5.1.78\_LUMAZINESYN-RXN : 1.0 1-deoxy-L-glycero-tetrol\_4-phosphate + 1.0 5-amino-6-(D-ribitylamino)uracil -> 1.0 H+ + 1.0 phosphate + 1.0 6,7-dimethyl-8-(1-D-ribityl)lumazine + 2.0 H2O

flavin-biosyn-I/7\_2.5.1.9\_RIBOFLAVIN-SYN-RXN : 1.0 H+ + 2.0 6,7-dimethyl-8-(1-D-ribityl)lumazine -> 1.0 5-amino-6-(D-ribitylamino)uracil + 1.0 riboflavin

flavin-biosyn-I/8\_2.7.1.26\_RIBOFLAVINKIN-RXN : 1.0 riboflavin + 1.0 ATP -> 1.0 FMN + 1.0 ADP + 1.0 H+

flavin-biosyn-I/9\_2.7.7.2\_FADSYN-RXN : 1.0 H+ + 1.0 FMN + 1.0 ATP -> 1.0 FAD + 1.0 diphosphate

##### phosphopantothenate biosynthesis I #####

phosphopantothenate-biosyn-I/1\_2.1.2.11\_3-CH3-2-OXOBUTANOATE-OH-CH3-XFER-RXN : 1.0 5,10-methylene-tetrahydrofolate + 1.0 H2O + 1.0 3-methyl-2-oxobutanoate <=> 1.0 2-dehydropantoate + 1.0 tetrahydropteroyl-tri-L-glutamate

phosphopantothenate-biosyn-I/2\_1.1.1.169\_2-DEHYDROPANTOATE-REDUCT-RXN : 1.0 (R)-pantoate + 1.0 NADP+ <- 1.0 NADPH + 1.0 2-dehydropantoate + 1.0 H+

phosphopantothenate-biosyn-I/3\_6.3.2.1\_PANTOATE-BETA-ALANINE-LIG-RXN : 1.0 (R)-pantoate + 1.0 beta-alanine + 1.0 ATP -> 1.0 diphosphate + 1.0 (R)-pantothenate + 1.0 AMP + 1.0 H+

phosphopantothenate-biosyn-I/4\_2.7.1.33\_PANTOTHENATE-KIN-RXN : 1.0 (R)-pantothenate + 1.0 ATP -> 1.0 (R)-4'-phosphopantothenate + 1.0 H+ + 1.0 ADP

##### coenzyme A biosyn #####

coenzyme-A-biosyn/1\_6.3.2.5\_P-PANTOCYSLIG-RXN : 1.0 L-cysteine + 1.0 CTP + 1.0 (R)-4'-phosphopantothenate -> 1.0 diphosphate + 1.0 CMP + 1.0 R-4'-phosphopantothenoyl-L-cysteine + 1.0 H+

coenzyme-A-biosyn/2\_4.1.1.36\_P-PANTOCYSEDECARB-RXN : 1.0 R-4'-phosphopantothenoyl-L-cysteine + 1.0 H+ -> 1.0 CO2 + 1.0 4'-phosphopantetheine

coenzyme-A-biosyn/3\_2.7.7.3\_PANTEADENYLTRAN-RXN : 1.0 H+ + 1.0 4'-phosphopantetheine + 1.0 ATP -> 1.0 diphosphate + 1.0 3'-dephospho-CoA

coenzyme-A-biosyn/4\_2.7.1.24\_DEPHOSPHOCOAKIN-RXN : 1.0 ATP + 1.0 3'-dephospho-CoA -> 1.0 ADP + 1.0 coenzyme\_A + 1.0 H+

##### 4-aminobenzoate biosynthesis #####

4-aminobenzoate-biosyn/1\_2.6.1.85\_PABASYN-RXN : 1.0 chorismate + 1.0 L-glutamine <=> 1.0 4-amino-4-deoxychorismate + 1.0 L-glutamate

4-aminobenzoate-biosyn/2\_4.1.3.38\_ADCLY-RXN : 1.0 4-amino-4-deoxychorismate <=> 1.0 4-aminobenzoate + 1.0 pyruvate + 1.0 H+

##### 6-hydroxymethyl-dihydropterin diphosphate biosynthesis I #####

6-hydroxymethyl-dihydropterin-PP-biosyn-I/1\_3.5.4.16\_R00428 : 1.0 GTP + 1.0 H2O -> 1.0 Formamidopyrimidine\_nucleoside\_triphosphate

6-hydroxymethyl-dihydropterin-PP-biosyn-I/2\_3.5.4.16\_R05046 : 1.0 Formamidopyrimidine\_nucleoside\_triphosphate + 1.0 H2O -> 1.0 N-(2,5-diamino-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-4-yl)-beta-D-ribofuranosylamine\_5'-triphosphate + 1.0 formate

6-hydroxymethyl-dihydropterin-PP-biosyn-I/3\_3.5.4.16\_R05048 : 1.0 N-(2,5-diamino-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-4-yl)-beta-D-ribofuranosylamine\_5'-triphosphate <=> 1.0 2,5-Diamino-6-(5'-triphosphoryl-3,4'-trihydroxy-2'-oxopentyl)-amino-4-oxopyrimidine

6-hydroxymethyl-dihydropterin-PP-biosyn-I/4\_moddir\_3.5.4.16\_R04639 : 1.0 7,8-dihydroneopterin\_3'-triphosphate + 1.0 H2O <=> 1.0 2,5-Diamino-6-(5'-triphosphoryl-3,4'-trihydroxy-2'-oxopentyl)-amino-4-oxopyrimidine

6-hydroxymethyl-dihydropterin-PP-biosyn-I/5\_3.6.1.67\_H2NEOPTERINP3PYROPHOSPHOHYDRO-RXN : 1.0 H2O + 1.0 7,8-dihydroneopterin\_3'-triphosphate -> 1.0 diphosphate + 1.0 7,8-dihydroneopterin\_3'-phosphate + 1.0 H+

6-hydroxymethyl-dihydropterin-PP-biosyn-I/6\_3.6.1.-\_DIHYDRONEOPTERIN-MONO-P-DEPHOS-RXN : 1.0 H2O + 1.0 7,8-dihydroneopterin\_3'-phosphate -> 1.0 7,8-dihydroneopterin + 1.0 phosphate

6-hydroxymethyl-dihydropterin-PP-biosyn-I/7\_4.1.2.25\_H2NEOPTERINALDOL-RXN : 1.0 7,8-dihydroneopterin <=> 1.0 glycolaldehyde + 1.0 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin

6-hydroxymethyl-dihydropterin-PP-biosyn-I/8\_2.7.6.3\_H2PTERIDINEPYROPHOSPHOKIN-RXN : 1.0 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin + 1.0 ATP -> 1.0 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin\_diphosphate + 1.0 AMP + 1.0 H+

##### THF biosyn #####

tetrahydrofolate-biosynthesis\_2.5.1.15\_H2PTEROATESYNTH-RXN : 1.0 4-aminobenzoate + 1.0 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin\_diphosphate -> 1.0 7,8-dihydropteroate + 1.0 diphosphate

tetrahydrofolate-biosynthesis\_6.3.2.17\_DIHYDROFOLATESYNTH-RXN : 1.0 L-glutamate + 1.0 ATP + 1.0 7,8-dihydropteroate -> 1.0 ADP + 1.0 H+ + 1.0 phosphate + 1.0 7,8-dihydrofolate\_monoglutamate

tetrahydrofolate-biosyn/3\_manual\_1.5.1.3\_HD-1.5.1.3 : 1.0 NADP+ + 1.0 tetrahydropteroyl-mono-L-glutamate <- 1.0 H+ + 1.0 NADPH + 1.0 7,8-dihydrofolate\_monoglutamate

# primary triglutamyl in *G. acidurici* [24]

tetrahydrofolate-biosyn/4\_manual\_6.3.2.17\_HD-6.3.2.17 : 1.0 tetrahydropteroyl-mono-L-glutamate + 2.0 L-glutamate + 2.0 ATP -> 1.0 tetrahydropteroyl-tri-L-glutamate + 2.0 ADP + 2.0 phosphate

```
##### folate transformations #####
folate-transformations/1_3.5.4.9_2.1.2.10_RXN-6321 : 1.0 5,10-methenyltetrahydrofolate + 1.0 H2O -> 1.0 H+ + 1.0
|N5-Formyl-THF-Glu-N|
folate-transformations/2_6.3.3.2_5-FORMYL-THF-CYCLO-LIGASE-RXN : 1.0 ATP + 1.0 |N5-Formyl-THF-Glu-N| -> 1.0 ADP +
1.0 phosphate + 1.0 5,10-methenyltetrahydrofolate
##### methyleryth path #####
methylerythritol-phosphate-pathway/1_2.2.1.7_DXS-RXN : 1.0 pyruvate + 1.0 H+ + 1.0 D-glyceraldehyde_3-phosphate ->
1.0 CO2 + 1.0 1-deoxy-D-xylulose_5-phosphate
methylerythritol-phosphate-pathway/2_1.1.1.267_DXPREDISOM-RXN : 1.0 2-C-methyl-D-erythritol_4-phosphate + 1.0 NADP+
<=> 1.0 NADPH + 1.0 1-deoxy-D-xylulose_5-phosphate + 1.0 H+
methylerythritol-phosphate-pathway/3_2.7.7.60_2.7.7.60-RXN : 1.0 H+ + 1.0 2-C-methyl-D-erythritol_4-phosphate +
1.0 CTP -> 1.0 diphosphate + 1.0 4-(cytidine_5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol
methylerythritol-phosphate-pathway/4_2.7.1.148_2.7.1.148-RXN : 1.0 ATP + 1.0
4-(cytidine_5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol -> 1.0 ADP + 1.0 H+ + 1.0
2-phospho-4-(cytidine_5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol
methylerythritol-phosphate-pathway/5_4.6.1.12_RXN0-302 : 1.0 2-phospho-4-(cytidine_5'-diphospho)-2-C-methyl-
D-erythritol -> 1.0 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate + 1.0 CMP
methylerythritol-phosphate-pathway/6_1.17.7.1_RXN0-882 : 2.0 |Oxidized-ferredoxins| + 1.0 H2O +
1.0 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl_4-diphosphate <- 2.0 |Reduced-ferredoxins| + 1.0 H+ + 1.0
2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate
methylerythritol-phosphate-pathway/7a_1.17.7.4_ISPH2-RXN : 1.0 isopentenyl_diphosphate + 2.0
|Oxidized-ferredoxins| + 1.0 H2O <- 2.0 H+ + 1.0 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl_4-diphosphate + 2.0
|Reduced-ferredoxins|
methylerythritol-phosphate-pathway/7b_1.17.7.4_RXN0-884 : 2.0 |Oxidized-ferredoxins| + 1.0 H2O + 1.0
dimethylallyl_diphosphate <- 1.0 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl_4-diphosphate + 2.0 |Reduced-ferredoxins| +
2.0 H+
##### farnesyl PP biosyn #####
farnesyl-PP-biosyn/1_2.5.1.1_GPPSYN-RXN : 1.0 dimethylallyl_diphosphate + 1.0 isopentenyl_diphosphate <=> 1.0
geranyl_diphosphate + 1.0 diphosphate
farnesyl-PP-biosyn/2a_2.5.1.10_FPPSYN-RXN : 1.0 geranyl_diphosphate + 1.0 isopentenyl_diphosphate <=> 1.0
(2E,6E)-farnesyl_diphosphate + 1.0 diphosphate
farnesyl-PP-biosyn/2b_2.5.1.10_BS421953 : 1.0 dimethylallyl_diphosphate + 1.0 geranyl_diphosphate <=> 1.0
diphosphate + 1.0 (2E,6E)-farnesyl_diphosphate
##### undecaprenyl PP biosyn #####
undecaprenyl-PP-biosyn_2.5.1.31_RXN-8999 : 1.0 (2E,6E)-farnesyl_diphosphate + 8.0 isopentenyl_diphosphate -> 8.0
diphosphate + 1.0 di-trans,octa-cis-undecaprenyl_diphosphate
##### 4-amino-2-methyl-5-diphosphomethylpyrimidine biosynthesis #####
4-amino-2-methyl-5-diphosphomethylpyrimidine-biosyn/1_4.1.99.17_PYRIMSYN1-RXN : 1.0 S-adenosyl-L-methionine + 1.0
5-amino-1-(5-phospho-beta-D-riboseyl)imidazole -> 1.0 4-amino-2-methyl-5-phosphomethylpyrimidine + 3.0 H+ + 1.0
L-methionine + 1.0 carbon_monoxide + 1.0 formate + 1.0 5'-deoxyadenosine
4-amino-2-methyl-5-diphosphomethylpyrimidine-biosyn/2_2.7.4.7_PYRIMSYN3-RXN : 1.0
4-amino-2-methyl-5-phosphomethylpyrimidine + 1.0 ATP -> 1.0 ADP + 1.0 4-amino-2-methyl-5-diphosphomethylpyrimidine
##### 5'-deoxyadenosine degradation #####
5'-deoxyadenosine-degr_3.2.2.16_3.2.2.1_3.2.2.9_RXN0-6550 : 1.0 H2O + 1.0 5'-deoxyadenosine -> 1.0 adenine + 1.0
5-deoxy-D-ribose
##### molybdenum cofactor biosynthesis #####
molybdenum-cofactor-biosynthesis/1_2.8.1.7_RXN0-308 : 1.0 |Cysteine-Desulfurase-L-cysteine| + 1.0 L-cysteine ->
1.0 L-alanine + 1.0 |L-Cysteine-Desulfurase-persulfide|
molybdenum-cofactor-biosynthesis/2_2.7.7.80_RXN-11361 : 1.0 ATP + 1.0 |MPT-Synthases| + 1.0 H+ -> 1.0 diphosphate +
1.0 |Carboxyadenylated-MPT-synthases|
molybdenum-cofactor-biosynthesis/3_mod_2.8.1.11_RXN-12473 : 2.0 |Reduced-ferredoxins| + 1.0
H+ + 1.0 |Carboxyadenylated-MPT-synthases| + 1.0 |L-Cysteine-Desulfurase-persulfide| -> 1.0
|Cysteine-Desulfurase-L-cysteine| + 1.0 AMP + 1.0 |Thiocarboxylated-MPT-synthases| + 2.0 |Oxidized-ferredoxins|
molybdenum-cofactor-biosynthesis/4_4.1.99.18_RXN-8340 : 1.0 GTP -> 1.0 cyclic_pyranopterin_phosphate + 1.0
diphosphate
molybdenum-cofactor-biosynthesis/5_2.8.1.12_RXN-8342 : 1.0 cyclic_pyranopterin_phosphate + 2.0
|Thiocarboxylated-MPT-synthases| + 1.0 H2O -> 1.0 molybdopterin + 2.0 |MPT-Synthases| + 4.0 H+
molybdenum-cofactor-biosynthesis/6_2.7.7.75_RXN-8344 : 1.0 ATP + 1.0 H+ + 1.0 molybdopterin -> 1.0
molybdopterin_adenine_dinucleotide + 1.0 diphosphate
molybdenum-cofactor-biosynthesis/7_2.10.1.1_RXN-8348 : 1.0 molybdopterin_adenine_dinucleotide + 1.0 molybdate +
1.0 H+ -> 1.0 MoO2-molybdopterin_cofactor + 1.0 AMP + 1.0 H2O
##### thiazole biosynthesis #####
thiazole-biosynthesis/1_2.8.1.7_RXN-9787 : 1.0 |Sulfur-Carrier-Proteins-ThiI| + 1.0 L-cysteine <=> 1.0 L-alanine +
1.0 |Sulfurylated-ThiI|
thiazole-biosynthesis/2_2.7.7.73_RXN-9789 : 1.0 H+ + 1.0 |Thi-S| + 1.0 ATP -> 1.0 |Adenylated-ThiS-Proteins| + 1.0
diphosphate
thiazole-biosynthesis/3_2.8.1.-_RXN-9788 : 2.0 |Reduced-ferredoxins| + 1.0 |Adenylated-ThiS-Proteins| + 1.0
|Sulfurylated-ThiI| -> 1.0 |Thiocarboxyadenylated-ThiS-Proteins| + 1.0 |Sulfur-Carrier-Proteins-ThiI| + 2.0
|Oxidized-ferredoxins| + 1.0 AMP
```

thiazole-biosynthesis/p4\_4.1.99.19\_RXN-11319 : 1.0 S-adenosyl-L-methionine + 1.0 NADPH + 1.0 L-tyrosine -> 1.0 5'-deoxyadenosine + 1.0 H+ + 1.0 NADP+ + 1.0 L-methionine + 1.0 2-iminoacetate + 1.0 4-methylphenol

thiazole-biosynthesis/4\_2.8.1.10\_THIAZOLSYN2-RXN : 1.0 1-deoxy-D-xylulose\_5-phosphate + 1.0 [Thiocarboxyadenylated-ThiS-Proteins] + 1.0 2-iminoacetate -> 2.0 H2O + 1.0 [Thi-S] + 1.0 2-[(2R,5Z)-2-carboxy-4-methylthiazol-5(2H)-ylidene]ethyl\_phosphate

##### thiamin diphosphate biosynthesis III (Staphylococcus) #####

thiamin-diphosphate-biosyn-III/1\_2.5.1.3\_RXN-12611 : 1.0 4-amino-2-methyl-5-diphosphomethylpyrimidine + 2.0 H+ + 1.0 2-[(2R,5Z)-2-carboxy-4-methylthiazol-5(2H)-ylidene]ethyl\_phosphate -> 1.0 thiamine\_phosphate + 1.0 diphosphate + 1.0 CO2

thiamin-diphosphate-biosyn-III/2\_3.1.3.2\_RXNQT-4191 : 1.0 thiamine\_phosphate + 1.0 H2O -> 1.0 phosphate + 1.0 thiamine

thiamin-diphosphate-biosyn-III/3\_2.7.6.2\_THIAMIN-PYROPHOSPHOKINASE-RXN : 1.0 thiamine + 1.0 ATP -> 1.0 H+ + 1.0 AMP + 1.0 thiamine\_diphosphate

##### thiamin salvage #####

thiamin-salvage/1\_3.5.99.2\_THIAMINASE-RXN : 1.0 thiamine + 1.0 H2O -> 1.0 H+ + 1.0 4-amino-2-methyl-5-pyrimidinemethanol + 1.0 5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazole

thiamin-salvage/2\_2.7.1.50\_THIAZOLSYN3-RXN : 1.0 ATP + 1.0 5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazole -> 1.0 H+ + 1.0 ADP + 1.0 4-methyl-5-(2-phosphonooxyethyl)thiazole

thiamin-salvage/p3\_2.7.1.49\_OHMETPYRKIN-RXN : 1.0 ATP + 1.0 4-amino-2-methyl-5-pyrimidinemethanol -> 1.0 ADP + 1.0 4-amino-2-methyl-5-phosphomethylpyrimidine + 1.0 H+

thiamin-salvage/4\_2.5.1.3\_THI-P-SYN-RXN : 1.0 4-methyl-5-(2-phosphonooxyethyl)thiazole + 1.0 4-amino-2-methyl-5-diphosphomethylpyrimidine + 1.0 H+ -> 1.0 diphosphate + 1.0 thiamine\_phosphate

##### tetrapyrrole biosynthesis I #####

tetrapyrrole-biosynthesis/1\_1.2.1.70\_GLUTRNAREDUCT-RXN : 1.0 [GLT-tRNAs] + 1.0 NADP+ + 1.0 (S)-4-amino-5-oxopentanoate <- 1.0 [Charged-GLT-tRNAs] + 1.0 NADPH

tetrapyrrole-biosynthesis/2\_5.4.3.8\_GSAAMINOTRANS-RXN : 1.0 (S)-4-amino-5-oxopentanoate -> 1.0 5-aminolevulinate

tetrapyrrole-biosynthesis/3\_4.2.1.24\_PORPHOBILSYNTH-RXN : 2.0 5-aminolevulinate -> 1.0 H+ + 1.0 porphobilinogen + 2.0 H2O

tetrapyrrole-biosynthesis/4\_2.5.1.61\_OHMETHYLBILANESYN-RXN : 4.0 porphobilinogen + 1.0 H2O -> 4.0 ammonium + 1.0 preuroporphyrinogen

tetrapyrrole-biosynthesis/5\_4.2.1.75\_UROGENIIISYN-RXN : 1.0 preuroporphyrinogen -> 1.0 H2O + 1.0 uroporphyrinogen-III

##### cobyrinate biosyn I #####

cobyrinate-biosyn-I/1\_2.1.1.107\_UROPORIIIMETHYLTRANSA-RXN : 1.0 uroporphyrinogen-III + 1.0 S-adenosyl-L-methionine -> 1.0 precorrin-1 + 1.0 S-adenosyl-L-homocysteine + 1.0 H+

cobyrinate-biosyn-I/2\_2.1.1.107\_RXN-8675 : 1.0 S-adenosyl-L-methionine + 1.0 precorrin-1 -> 1.0 S-adenosyl-L-homocysteine + 1.0 precorrin-2

cobyrinate-biosyn-I/3\_1.3.1.76\_DIMETHUROPORDEHYDROG-RXN : 1.0 NAD+ + 1.0 precorrin-2 <=> 2.0 H+ + 1.0 NADH + 1.0 sirohydrochlorin

cobyrinate-biosyn-I/4\_4.99.1.3\_4.99.1.3-RXN : 1.0 sirohydrochlorin + 1.0 Co2+ -> 1.0 cobalt-sirohydrochlorin + 2.0 H+

cobyrinate-biosyn-I/5\_2.1.1.151\_2.1.1.151-RXN : 1.0 cobalt-sirohydrochlorin + 1.0 S-adenosyl-L-methionine -> 1.0 cobalt-factor\_III + 1.0 S-adenosyl-L-homocysteine + 1.0 H+

# Electron donor may be thioredoxin [46]

cobyrinate-biosyn-I/6\_mod\_2.1.1.272\_RXN-14314 : 1.0 [Red-Thioredoxin] + 1.0 cobalt-factor\_III + 1.0 S-adenosyl-L-methionine -> 1.0 cobalt-precorrin-4 + 1.0 [Ox-Thioredoxin] + 1.0 S-adenosyl-L-homocysteine

cobyrinate-biosyn-I/7\_2.1.1.271\_RXN-8762 : 1.0 cobalt-precorrin-4 + 1.0 S-adenosyl-L-methionine -> 1.0 S-adenosyl-L-homocysteine + 1.0 cobalt-precorrin-5A + 1.0 H+

cobyrinate-biosyn-I/8\_3.7.1.12\_RXN-8763 : 1.0 cobalt-precorrin-5A + 1.0 H2O -> 1.0 acetaldehyde + 1.0 cobalt-precorrin-5B + 1.0 H+

cobyrinate-biosyn-I/9\_2.1.1.195\_RXN-8764 : 1.0 cobalt-precorrin-5B + 1.0 S-adenosyl-L-methionine -> 1.0 S-adenosyl-L-homocysteine + 1.0 cobalt-precorrin-6A

cobyrinate-biosyn-I/10\_1.3.1.106\_RXN-8765 : 1.0 cobalt-precorrin-6B + 1.0 NAD+ <- 1.0 cobalt-precorrin-6A + 1.0 NADH

cobyrinate-biosyn-I/11\_2.1.1.196\_RXN-8766 : 1.0 cobalt-precorrin-6B + 1.0 S-adenosyl-L-methionine + 1.0 H+ -> 1.0 cobalt-precorrin-7 + 1.0 CO2 + 1.0 S-adenosyl-L-homocysteine

cobyrinate-biosyn-I/12\_2.1.1.289\_RXN-8767 : 1.0 S-adenosyl-L-methionine + 1.0 cobalt-precorrin-7 -> 1.0 S-adenosyl-L-homocysteine + 1.0 cobalt-precorrin-8

cobyrinate-biosyn-I/13\_5.4.99.60\_RXN-8768 : 1.0 cobalt-precorrin-8 -> 1.0 H+ + 1.0 cobyrinate

cobyrinate-biosyn-I/14\_6.3.5.11\_RXN-14256 : 1.0 H2O + 1.0 L-glutamine + 1.0 cobyrinate + 1.0 ATP -> 1.0 cob(II)yrinate\_c-monoamide + 1.0 ADP + 1.0 H+ + 1.0 L-glutamate + 1.0 phosphate

cobyrinate-biosyn-I/15\_6.3.5.11\_RXN-14257 : 1.0 L-glutamine + 1.0 cob(II)yrinate\_c-monoamide + 1.0 ATP + 1.0 H2O -> 1.0 L-glutamate + 1.0 cob(II)yrinate\_a,c-diamide + 1.0 ADP + 1.0 H+ + 1.0 phosphate

##### 5,6-dimethylbenzimidazole biosyn II #####

# 4.1.99.M1: Ferredoxins as a guess

5,6-dimethylbenzimidazole-biosyn-II/1\_4.1.99.M1\_RXN-17122 : 1.0 5-amino-1-(5-phospho-beta-D-ribose)imidazole + 1.0 S-adenosyl-L-methionine + 2.0 [Reduced-ferredoxins] -> 1.0 5-hydroxy-benzimidazole + 1.0 ammonium + 1.0 formate + 1.0 5'-deoxyadenosine + 1.0 L-methionine + 1.0 phosphate + 2.0 [Oxidized-ferredoxins]

5,6-dimethylbenzimidazole-biosyn-II/2\_2.1.1.M9\_RXN-17123 : 1.0 5-hydroxy-benzimidazole + 1.0

## Anhang

---

```
S-adenosyl-L-methionine -> 1.0 5-methoxy-benzimidazole + 1.0 S-adenosyl-L-homocysteine + 1.0 H+
5,6-dimethylbenzimidazole-biosyn-II/3.2.1.1.M10_RXN-17124 : 1.0 5-methoxy-benzimidazole + 1.0
S-adenosyl-L-methionine -> 1.0 5-methoxy-6-methylbenzimidazole + 1.0 S-adenosyl-L-homocysteine + 1.0 H+
# mechanism completely unclear
5,6-dimethylbenzimidazole-biosyn-II/4_unknown_RXN-17125 : 1.0 5-methoxy-6-methylbenzimidazole ->
5,6-dimethylbenzimidazole
##### adenosylcobalamin biosyn I #####
# 1.16.8.1: NADH as a guess
adenosylcobalamin-biosynthesis-I/1_mod_1.16.8.1_R343-RXN : 2.0 H+ + 1.0 NAD+ + 2.0 cob(I)yrinate_a,c-diamide <-
2.0 cob(II)yrinate_a,c-diamide + 1.0 NADH
adenosylcobalamin-biosynthesis-I/2_2.5.1.17_R344-RXN : 1.0 cob(I)yrinate_a,c-diamide + 1.0 ATP -> 1.0
adenosyl-cobyrinate_a,c-diamide + 1.0 PPi
adenosylcobalamin-biosynthesis-I/3_6.3.5.10_R345-RXN : 4.0 L-glutamine + 1.0 adenosyl-cobyrinate_a,c-diamide + 4.0
ATP + 4.0 H2O -> 4.0 ADP + 4.0 H+ + 4.0 L-glutamate + 4.0 phosphate + 1.0 adenosylcobylate
adenosylcobalamin-biosynthesis-I/pp4_2.7.1.177_RXN-8626 : 1.0 L-threonine + 1.0 ATP -> 1.0
L-threonine_3-0-phosphate + 1.0 ADP + 1.0 H+
adenosylcobalamin-biosynthesis-I/p4_4.1.1.81_4.1.1.81-RXN : 1.0 L-threonine_3-0-phosphate + 1.0 H+ -> 1.0 CO2 +
1.0 (R)-1-amino-2-propanol_0-2-phosphate
adenosylcobalamin-biosynthesis-I/4_6.3.1.10_RXN-6261 : 1.0 ATP + 1.0 (R)-1-amino-2-propanol_0-2-phosphate + 1.0
adenosylcobylate -> 1.0 phosphate + 1.0 ADP + 1.0 adenosyl-cobinamide_phosphate + 1.0 H+
adenosylcobalamin-biosynthesis-I/5_2.7.7.62_COBINPGUANYLYLTRANS-RXN : 1.0 H+ + 1.0 GTP + 1.0
adenosyl-cobinamide_phosphate <=> 1.0 diphosphate + 1.0 adenosylcobinamide-GDP
adenosylcobalamin-biosynthesis-I/pp6_6.3.4.21_NICOTINATEPRIBOSYLTRANS-RXN : 1.0 ATP + 1.0 H2O + 1.0
5-phospho-alpha-D-ribose_1-diphosphate + 1.0 nicotinate -> 1.0 beta-nicotinate_D-ribonucleotide + 1.0 phosphate +
1.0 ADP + 1.0 diphosphate
adenosylcobalamin-biosynthesis-I/p6_2.4.2.21_DMBPPRIBOSYLTRANS-RXN : 1.0 beta-nicotinate_D-ribonucleotide + 1.0
5,6-dimethylbenzimidazole -> 1.0 nicotinate + 1.0 alpha-ribazole_5'-phosphate + 1.0 H+
adenosylcobalamin-biosynthesis-I/6a_2.7.8.26_COBALAMIN5PSYN-RXN : 1.0 alpha-ribazole_5'-phosphate + 1.0
adenosylcobinamide-GDP -> 1.0 adenosylcobalamin_5'-phosphate + 1.0 H+ + 1.0 GMP
adenosylcobalamin-biosynthesis-I/7a_3.1.3.73_RXN-8770 : 1.0 adenosylcobalamin_5'-phosphate + 1.0 H2O -> 1.0
adenosylcobalamin + 1.0 phosphate
adenosylcobalamin-biosynthesis-I/6b_3.1.3.73_RIBAZOLEPHOSPHAT-RXN : 1.0 alpha-ribazole_5'-phosphate + 1.0 H2O ->
1.0 alpha-ribazole + 1.0 phosphate
adenosylcobalamin-biosynthesis-I/7b_2.7.8.26_COBALAMINSYN-RXN : 1.0 alpha-ribazole + 1.0 adenosylcobinamide-GDP
<=> 1.0 adenosylcobalamin + 1.0 GMP + 1.0 H+
##### protoporphyrin biosynthesis #####
protoporphyrin-biosyn/1_4.1.1.37_UROGENDECARBOX-RXN : 1.0 uroporphyrinogen-III + 4.0 H+ -> 4.0 CO2 + 1.0
coproporphyrinogen_III
protoporphyrin-biosyn/2_modnames_1.3.99.22_HEMN-RXN : 1.0 coproporphyrinogen_III + 2.0 S-adenosyl-L-methionine ->
1.0 protoporphyrin_IX + 2.0 L-methionine + 2.0 5'-deoxyadenosine + 2.0 CO2
protoporphyrin-biosyn/3_6.6.1.1_RXN1F-20 : 1.0 ATP + 1.0 H2O + 1.0 protoporphyrin_IX + 1.0 Mg2+ -> 1.0 phosphate +
1.0 Mg-protoporphyrin + 1.0 ADP + 3.0 H+
##### biotin carboxyl carrier protein assembly #####
biotin-carboxyl-carrier-protein-assembly/1_6.3.4.15_BIOTINLIG-RXN : 1.0 biotin + 1.0 ATP + 1.0 [BCCP-monomers] ->
1.0 H+ + 1.0 diphosphate + 1.0 AMP + 1.0 [BCCP-biotin-monomers]
biotin-carboxyl-carrier-protein-assembly/2_spontaneous_RXN-7101 : 2.0 [BCCP-biotin-monomers] -> 1.0 [BCCP-dimers]
biotin-carboxyl-carrier-protein-assembly/3_6.3.4.14_BIOTIN-CARBOXYL-RXN : 1.0 ATP + 1.0 [BCCP-dimers] + 1.0
hydrogen_carbonate -> 1.0 H+ + 1.0 phosphate + 1.0 ADP + 1.0 [Carboxybiotin-BCCP]
##### pyridoxal #####
PLP-biosyn_2.7.1.49_PNKIN-RXN : 1.0 ATP + 1.0 pyridoxine -> 1.0 ADP + 1.0 pyridoxine_5'-phosphate + 1.0 H+
##### L-threonylcarbamoyladenylate #####
L-threonylcarbamoyladenylate_2.7.7.87_RXN-14569 : 1.0 hydrogen_carbonate + 1.0 L-threonine + 1.0 ATP <=> 1.0
diphosphate + 1.0 L-threonylcarbamoyladenylate + 1.0 H2O
##### NXP de novo biosyn #####
diphosphate_3.6.1.1_INORGPYROPHOSPHAT-RXN : 1.0 H2O + 1.0 diphosphate -> 2.0 phosphate + 1.0 H+
triphosphate_3.6.1.1_modb_BS383385 : 2.0 H2O + 1.0 PPi -> 3.0 phosphate + 1.0 H+
diphosphate_2.7.11.32_RXN-13757 : 1.0 ADP + 1.0 [pyruvate-phosphate-dikinase] -> 1.0 H+ + 1.0 AMP + 1.0
[pyruvate-phosphate-dikinase-phosphate]
diphosphate_2.7.4.27_RXN-13756 : 1.0 [pyruvate-phosphate-dikinase-phosphate] + 1.0 H+ + 1.0 phosphate <=> 1.0
diphosphate + 1.0 [pyruvate-phosphate-dikinase]
# AMP
adenosine-ribonucleotides-de-novo-biosyn/1_6.3.4.4_ADENYLOSUCCINATE-SYNTHASE-RXN : 1.0 L-aspartate + 1.0 IMP + 1.0
GTP -> 1.0 GDP + 1.0 adenylo-succinate + 2.0 H+ + 1.0 phosphate
adenosine-ribonucleotides-de-novo-biosyn/2_4.3.2.2_AMPsyn-RXN : 1.0 adenylo-succinate <=> 1.0 fumarate + 1.0 AMP
# GMP
guanosine-ribonucleotides-de-novo-biosyn/1_1.1.1.205_IMP-DEHYDROG-RXN : 1.0 H2O + 1.0 NAD+ + 1.0 IMP <=> 1.0 NADH +
1.0 XMP + 1.0 H+
guanosine-ribonucleotides-de-novo-biosyn/2_6.3.5.2_GMP-SYN-GLUT-RXN : 1.0 L-glutamine + 1.0 ATP + 1.0 XMP + 1.0
H2O -> 1.0 AMP + 1.0 diphosphate + 2.0 H+ + 1.0 GMP + 1.0 L-glutamate
```



```

# UMP
UMP-biosyn/1_2.1.3.2_ASPCARBTRANS-RXN : 1.0 carbamoyl_phosphate + 1.0 L-aspartate <=> 1.0 N-carbamoyl-L-aspartate +
1.0 phosphate + 1.0 H+
UMP-biosyn/2_moddir_3.5.2.3_DIHYDROOROT-RXN : 1.0 H2O + 1.0 (S)-dihydroorotate <=> 1.0 N-carbamoyl-L-aspartate +
1.0 H+
UMP-biosyn/3_1.3.1.14_OROTATE-REDUCTASE-NADH-RXN : 1.0 NAD+ + 1.0 (S)-dihydroorotate <=> 1.0 orotate + 1.0 H+ +
1.0 NADH
UMP-biosyn/4_2.4.2.10_OROPRIBTRANS-RXN : 1.0 diphosphate + 1.0 orotidine_5'-phosphate <=> 1.0 orotate + 1.0
5-phospho-alpha-D-ribose_1-diphosphate
UMP-biosyn/5_4.1.1.23_OROTPDECARB-RXN : 1.0 orotidine_5'-phosphate + 1.0 H+ -> 1.0 CO2 + 1.0 UMP
# CTP
CTP-biosyn/2_6.3.4.2_CTPSYN-RXN : 1.0 L-glutamine + 1.0 H2O + 1.0 UTP + 1.0 ATP -> 1.0 CTP + 1.0 ADP + 2.0 H+ + 1.0
phosphate + 1.0 L-glutamate
# UTP
UTP-biosyn/3_5.4.5_RXN-14118 : 1.0 H2O + 1.0 H+ + 1.0 CTP -> 1.0 ammonium + 1.0 UTP
# XDP -> dXDP
deoxyribonucleotides-biosyn_1.17.4.1_ADPREDUCT-RXN : 1.0 dADP + 1.0 [Ox-Thioredoxin] + 1.0 H2O <=> 1.0 ADP + 1.0
[Red-Thioredoxin]
deoxyribonucleotides-biosyn_1.17.4.1_GDPREDUCT-RXN : 1.0 [Ox-Thioredoxin] + 1.0 H2O + 1.0 dGDP <- 1.0 GDP + 1.0
[Red-Thioredoxin]
deoxyribonucleotides-biosyn_1.17.4.1_CDPREDUCT-RXN : 1.0 H2O + 1.0 [Ox-Thioredoxin] + 1.0 dCDP <- 1.0
[Red-Thioredoxin] + 1.0 CDP
deoxyribonucleotides-biosyn_1.17.4.1_UDPREDUCT-RXN : 1.0 [Ox-Thioredoxin] + 1.0 H2O + 1.0 dUDP <- 1.0
[Red-Thioredoxin] + 1.0 UDP
# [Oxidized-flavodoxins] -> [Ox-Thioredoxin] because of BRENDA 1.17.4.2 and Clostridium sp.
deoxyribonucleotides-biosyn_mod_1.17.4.2_RXN0-723 : 1.0 [Ox-Thioredoxin] + 1.0 dCTP + 1.0 H2O <- 1.0 CTP + 1.0
[Red-Thioredoxin]
deoxyribonucleotides-biosyn_mod_1.17.4.2_RXN0-724 : 1.0 H2O + 1.0 [Ox-Thioredoxin] + 1.0 dUTP <- 1.0 UTP + 1.0
[Red-Thioredoxin]
deoxyribonucleotides-biosyn_mod_1.17.4.2_RXN0-745 : 1.0 [Ox-Thioredoxin] + 1.0 dATP + 1.0 H2O <- 1.0
[Red-Thioredoxin] + 1.0 ATP
deoxyribonucleotides-biosyn_mod_1.17.4.2_RXN0-746 : 1.0 [Ox-Thioredoxin] + 1.0 H2O + 1.0 dGTP <- 1.0 GTP + 1.0
[Red-Thioredoxin]
# dTTP
dTTP-biosyn/1_3.6.1.23_DUTP-PYROP-RXN : 1.0 H2O + 1.0 dUTP -> 1.0 diphosphate + 1.0 dUMP + 1.0 H+
dTTP-biosyn/2_2.1.1.148_RXN-8850 : 1.0 NADPH + 1.0 5,10-methylene-tetrahydrofolate + 1.0 H+ + 1.0 dUMP -> 1.0
tetrahydropteroyl_tri-L-glutamate + 1.0 dTMP + 1.0 NADP+
##### (d)NMP degradation #####
# RNA-Abbau
# CMP
CMP-salvage/1_3.1.3.5_RXN-14026 : 1.0 H2O + 1.0 CMP -> 1.0 cytidine + 1.0 phosphate
CMP-salvage/2a_2.7.1.48_CYTIDINE-RXN : 1.0 cytidine + 1.0 ATP -> 1.0 ADP + 1.0 H+ + 1.0 CMP
CMP-salvage/2b_3.5.4.5_CYTIDAM2-RXN : 1.0 H2O + 1.0 H+ + 1.0 cytidine -> 1.0 ammonium + 1.0 uridine
CMP-salvage/2c_2.4.2.2_BS355365 : 1.0 cytidine + 1.0 phosphate <=> 1.0 cytosine + 1.0 alpha-D-ribose-1-phosphate
# UMP
UMP-salvage/1_3.1.3.5_3.1.3.2_RXN-14025 : 1.0 H2O + 1.0 UMP -> 1.0 uridine + 1.0 phosphate
UMP-salvage/2a_2.7.1.48_URIDINE-RXN : 1.0 ATP + 1.0 uridine -> 1.0 H+ + 1.0 ADP + 1.0 UMP
UMP-salvage/2b_2.4.2.2_URPHOS-RXN : 1.0 phosphate + 1.0 uridine <=> 1.0 alpha-D-ribose-1-phosphate + 1.0 uracil
UMP-salvage/3_2.4.2.9_URACIL-PRIBOSYLTRANS-RXN : 1.0 UMP + 1.0 diphosphate <- 1.0
5-phospho-alpha-D-ribose_1-diphosphate + 1.0 uracil
# AMP
AMP-salvage/1_3.1.3.5_3.1.3.2_AMP-DEPHOSPHORYLATION-RXN : 1.0 H2O + 1.0 AMP -> 1.0 phosphate + 1.0 adenosine
AMP-salvage/2_2.4.2.1_ADENPHOSPHOR-RXN : 1.0 adenosine + 1.0 phosphate <=> 1.0 adenine + 1.0
alpha-D-ribose-1-phosphate
AMP-salvage/3_2.4.2.8_2.4.2.7_ADENPRIBOSYLTRAN-RXN : 1.0 AMP + 1.0 diphosphate <- 1.0 adenine + 1.0
5-phospho-alpha-D-ribose_1-diphosphate
# GMP
GMP-salvage/1_3.1.3.5_3.1.3.2_RXN-7609 : 1.0 H2O + 1.0 GMP -> 1.0 guanosine + 1.0 phosphate
GMP-salvage/2_2.4.2.1_RXN0-5199 : 1.0 guanosine + 1.0 phosphate <=> 1.0 guanine + 1.0 alpha-D-ribose-1-phosphate
GMP-salvage/3_3.5.4.3_GUANINE-DEAMINASE-RXN : 1.0 H2O + 1.0 H+ + 1.0 guanine -> 1.0 ammonium + 1.0 xanthine
GMP-salvage/4_2.4.2.8_2.4.2.22_XANPRIBOSYLTRAN-RXN : 1.0 XMP + 1.0 diphosphate <- 1.0 xanthine + 1.0
5-phospho-alpha-D-ribose_1-diphosphate
# XMP
XMP-salvage/1_3.1.3.5_XMPXAN-RXN : 1.0 XMP + 1.0 H2O -> 1.0 phosphate + 1.0 xanthosine
XMP-salvage/2_2.4.2.1_XANTHOSINEPHOSPHORY-RXN : 1.0 phosphate + 1.0 xanthosine -> 1.0 alpha-D-ribose-1-phosphate +
1.0 xanthine
# IMP
IMP-salvage_3.1.3.5_RXN-7607 : 1.0 IMP + 1.0 H2O -> 1.0 inosine + 1.0 phosphate
# adenosine salvage

```

```

adenosine-salvage/pa1_3.1.3.5_3.1.3.2_BS73811 : 2.0 H2O + 1.0 ADP -> 2.0 phosphate + 1.0 adenosine
adenosine-salvage/pb1_3.1.3.5_BS73810 : 1.0 H2O + 1.0 ADP -> 1.0 diphosphate + 1.0 adenosine
adenosine-salvage/1_3.5.4.4_ADENODEAMIN-RXN : 1.0 H2O + 1.0 adenosine + 1.0 H+ -> 1.0 ammonium + 1.0 inosine
adenosine-salvage/2_2.4.2.1_INOPHOSPHOR-RXN : 1.0 phosphate + 1.0 inosine <=> 1.0 alpha-D-ribose-1-phosphate + 1.0
hypoxanthine
adenosine-salvage/3_1.17.1.4_RXN-7682 : 1.0 H2O + 1.0 NAD+ + 1.0 hypoxanthine -> 1.0 xanthine + 1.0 H+ + 1.0 NADH
# DNA-Abbau
# dCMP
dCMP-salvage/1a_3.1.3.5_RXN0-5292 : 1.0 dCMP + 1.0 H2O -> 1.0 2'-deoxycytidine + 1.0 phosphate
dCMP-salvage/2_3.5.4.5_CYTIDEAM-RXN : 1.0 H+ + 1.0 H2O + 1.0 2'-deoxycytidine -> 1.0 2'-deoxyuridine + 1.0
ammonium
dCMP-salvage/11b_3.5.4.12_DCMP-DEAMINASE-RXN : 1.0 H2O + 1.0 H+ + 1.0 dCMP -> 1.0 dUMP + 1.0 ammonium
# dUMP
dUMP-salvage/1_3.1.3.5_RXN-14143 : 1.0 H2O + 1.0 dUMP -> 1.0 phosphate + 1.0 2'-deoxyuridine
dUMP-salvage/2_2.4.2.1_2.4.2.2_URA-PHOSPH-RXN : 1.0 phosphate + 1.0 2'-deoxyuridine <=> 1.0 uracil + 1.0
2-deoxy-alpha-D-ribose_1-phosphate
# dAMP
dAMP-salvage/1_3.1.3.5_3.1.3.2_RXN-14161 : 1.0 H2O + 1.0 dAMP -> 1.0 2'-deoxyadenosine + 1.0 phosphate
dAMP-salvage/2a_2.4.2.1_DEOXYADENPHOSPHOR-RXN : 1.0 phosphate + 1.0 2'-deoxyadenosine <=> 1.0 adenine + 1.0
2-deoxy-alpha-D-ribose_1-phosphate
dAMP-salvage/2b_3.5.4.4_ADDALT-RXN : 1.0 H+ + 1.0 H2O + 1.0 2'-deoxyadenosine -> 1.0 ammonium + 1.0
2'-deoxyinosine
dAMP-salvage/3_2.4.2.1_DEOXYINOPHOSPHOR-RXN : 1.0 phosphate + 1.0 2'-deoxyinosine <=> 1.0 hypoxanthine + 1.0
2-deoxy-alpha-D-ribose_1-phosphate
# dGMP
dGMP-salvage/1_3.1.3.5_3.1.3.2_RXN-14142 : 1.0 H2O + 1.0 dGMP -> 1.0 phosphate + 1.0 2'-deoxyguanosine
dGMP-salvage/2_2.4.2.1_DEOXYGUANPHOSPHOR-RXN : 1.0 phosphate + 1.0 2'-deoxyguanosine <=> 1.0
2-deoxy-alpha-D-ribose_1-phosphate + 1.0 guanine
# dTMP
dTMP-salvage/1_3.1.3.5_THYMIDYLATE-5-PHOSPHATASE-RXN : 1.0 H2O + 1.0 dTMP -> 1.0 phosphate + 1.0 thymidine
dTMP-salvage/2_2.4.2.2_THYM-PHOSPH-RXN : 1.0 thymidine + 1.0 phosphate <=> 1.0 thymine + 1.0
2-deoxy-alpha-D-ribose_1-phosphate
# Salvage - like guanine and guanosine salvage II
# adenosine
adenosine-salvage/1_3.2.2.1_BR16044 : 1.0 adenosine + 1.0 H2O -> 1.0 beta-D-ribosepyranose + 1.0 adenine
adenosine-salvage/2_3.5.4.2_ADENINE-DEAMINASE-RXN : 1.0 H2O + 1.0 H+ + 1.0 adenine -> 1.0 hypoxanthine + 1.0
ammonium
# guanosine
guanosine-salvage/1_3.2.2.1_RXN0-366 : 1.0 H2O + 1.0 guanosine -> 1.0 beta-D-ribosepyranose + 1.0 guanine
guanosine-salvage/2_2.4.2.8_2.4.2.7_2.4.2.22_GUANPRIBOSYLTRAN-RXN : 1.0 GMP + 1.0 diphosphate <=> 1.0 guanine +
1.0 5-phospho-alpha-D-ribose_1-diphosphate
# inosine
inosine-salvage/1_3.2.2.1_BR16042 : 1.0 inosine + 1.0 H2O -> 1.0 hypoxanthine + 1.0 beta-D-ribosepyranose
inosine-salvage/2_2.4.2.8_HYOXANPRIBOSYLTRAN-RXN : 1.0 diphosphate + 1.0 IMP <=> 1.0 hypoxanthine + 1.0
5-phospho-alpha-D-ribose_1-diphosphate
# xanthosine
xanthosine-salvage_3.2.2.1_RXN0-363 : 1.0 xanthosine + 1.0 H2O -> 1.0 beta-D-ribosepyranose + 1.0 xanthine
# cytidine
cytidine-salvage_3.2.2.1_BS214504 : 1.0 cytidine + 1.0 H2O -> 1.0 cytosine + 1.0 beta-D-ribosepyranose
##### 2'-deoxy-α-D-ribose 1-phosphate degradation #####
2'-deoxy-alpha-D-ribose-1-phosphate-degr/1_5.4.2.7_D-PPENTOMUT-RXN : 1.0 2-deoxy-alpha-D-ribose_1-phosphate <=>
1.0 2-deoxy-D-ribose_5-phosphate
2'-deoxy-alpha-D-ribose-1-phosphate-degr/2_4.1.2.4_DEOXYRIBOSE-P-ALD-RXN : 1.0 2-deoxy-D-ribose_5-phosphate <=>
1.0 D-glyceraldehyde_3-phosphate + 1.0 acetaldehyde
acetaldehyde-degradation_1_2.1.3.1_1.17.1.4_RXN66-3 : 1.0 H2O + 1.0 NAD+ + 1.0 acetaldehyde -> 1.0 acetate + 2.0 H+ +
1.0 NADH
# alpha-D-ribose-1-phosphate degradation
PRPP-biosynthesis-II_5.4.2.2_5.4.2.7_PPENTOMUT-RXN : 1.0 alpha-D-ribose-1-phosphate <=> 1.0 D-ribose_5-phosphate
# beta-D-ribosepyranose degradation
beta-D-ribosepyranose-degradation_modb_2.7.1.15_BR47755 : 1.0 ATP + 1.0 beta-D-ribosepyranose -> 1.0
D-ribose_5-phosphate + 1.0 ADP + 1.0 H+
##### (d)NXP-transitions (2.7.4.25,2.7.4.3,2.7.4.22,2.7.4.8,2.7.4.9 + not sequence based: 2.7.4.6)
#####
NXP-transitions_2.7.4.3_RXN-14074 : 1.0 GTP + 1.0 AMP -> 1.0 ADP + 1.0 GDP
NXP-transitions_2.7.4.8_GUANYL-KIN-RXN : 1.0 ATP + 1.0 GMP -> 1.0 ADP + 1.0 GDP
NXP-transitions_2.7.4.6_GDPKIN-RXN : 1.0 ATP + 1.0 GDP -> 1.0 ADP + 1.0 GTP
NXP-transitions_2.7.4.22_RXN-12002 : 1.0 UMP + 1.0 ATP -> 1.0 ADP + 1.0 UDP
NXP-transitions_2.7.4.3_BS358186 : 1.0 UTP + 1.0 AMP -> 1.0 ADP + 1.0 UDP
NXP-transitions_2.7.4.25_2.7.4.3_RXN-11832 : 1.0 CMP + 1.0 ATP -> 1.0 ADP + 1.0 CDP

```

```
NXP-transitions_2.7.4.3_CDPKIN-RXN : 1.0 ATP + 1.0 CDP -> 1.0 ADP + 1.0 CTP
NXP-transitions_2.7.4.3_ADENYL-KIN-RXN : 1.0 ATP + 1.0 AMP -> 2.0 ADP
NXP-transitions_2.7.4.3_DEOXYADENYLATE-KINASE-RXN : 1.0 dAMP + 1.0 ATP -> 1.0 ADP + 1.0 dADP
NXP-transitions_2.7.4.8_GMKALT-RXN : 1.0 dGMP + 1.0 ATP -> 1.0 ADP + 1.0 dGDP
NXP-transitions_2.7.4.25_RXN-7913 : 1.0 ATP + 1.0 dCMP -> 1.0 ADP + 1.0 dCDP
NXP-transitions_2.7.4.9_DTMPKI-RXN : 1.0 dTMP + 1.0 ATP -> 1.0 dTDP + 1.0 ADP
NXP-transitions_2.7.4.9_RXN-17141 : 1.0 GTP + 1.0 dTMP -> 1.0 GDP + 1.0 dTDP
NXP-transitions_2.7.4.6_DTDPKIN-RXN : 1.0 dTDP + 1.0 ATP -> 1.0 ADP + 1.0 dTTP
NXP-transitions_2.7.4.22_2.7.4.9_2.7.4.25_RXN-14122 : 1.0 ATP + 1.0 dUMP -> 1.0 ADP + 1.0 dUDP
NXP-transitions_2.7.4.6_DADPKIN-RXN : 1.0 dADP + 1.0 ATP -> 1.0 ADP + 1.0 dATP
NXP-transitions_2.7.4.6_DGDPKIN-RXN : 1.0 dGDP + 1.0 ATP -> 1.0 ADP + 1.0 dGTP
NXP-transitions_2.7.4.6_DUDPKIN-RXN : 1.0 ATP + 1.0 dUDP -> 1.0 ADP + 1.0 dUTP
NXP-transitions_2.7.4.6_DCDPKIN-RXN : 1.0 dCDP + 1.0 ATP -> 1.0 ADP + 1.0 dCTP
##### ppGpp #####
ppGpp-biosynthesis_2.7.6.5_GDPPYPHOSKIN-RXN : 1.0 GDP + 1.0 ATP -> 1.0 AMP + 1.0 ppGpp
ppGpp-biosynthesis_2.7.6.5_GTPPYPHOSKIN-RXN : 1.0 GTP + 1.0 ATP -> 1.0 AMP + 1.0 pppGpp
ppGpp-biosynthesis_3.6.1.40_PPPGPPHYDRO-RXN : 1.0 H2O + 1.0 pppGpp -> 1.0 ppGpp + 1.0 phosphate + 1.0 H+
##### uracil degr I #####
uracil-degr-I/1.3.1.1_DIIHYDROURACIL-DEHYDROGENASE-NAD+-RXN : 1.0 5,6-dihydrouracil + 1.0 NAD+ <=> 1.0 H+ + 1.0 NADH + 1.0 uracil
uracil-degr-I/2.3.5.2.2_DIIHYDROPYRIMIDINASE-RXN : 1.0 5,6-dihydrouracil + 1.0 H2O -> 1.0 3-ureidopropanoate + 1.0 H+
uracil-degr-I/3.5.1.6_BETA-UREIDOPROPIONASE-RXN : 2.0 H+ + 1.0 3-ureidopropanoate + 1.0 H2O -> 1.0 ammonium + 1.0 CO2 + 1.0 beta-alanine
# thymine degr
thymine-degradation_1.3.1.1_RXN0-6565 : 1.0 NAD+ + 1.0 5,6-dihydrothymine <=> 1.0 thymine + 1.0 H+ + 1.0 NADH
thymine-degradation_3.5.2.2_RXN-11211 : 1.0 5,6-dihydrothymine + 1.0 H2O -> 1.0 (R)-3-ureido-isobutanoate + 1.0 H+
thymine-degradation_3.5.1.6_RXN-11210 : 1.0 H2O + 2.0 H+ + 1.0 (R)-3-ureido-isobutanoate -> 1.0 (R)-3-amino-2-methylpropanoate + 1.0 CO2 + 1.0 ammonium
##### Non-MDM/CDMM substrates #####
##### cytosine #####
cytosine_exchange : 1.0 cytosine[ex] <=>
thymine_exchange : 1.0 thymine[ex] <=>
## CDIF630erm_01905; CDIF630erm_03001
cytosine_transport : 1.0 Na+ + 1.0 cytosine <=> 1.0 cytosine[ex] + 1.0 Na+[ex]
thymine_transport : 1.0 Na+ + 1.0 thymine <=> 1.0 thymine[ex] + 1.0 Na+[ex]
##### adenine/guanine/hypoxanthine #####
adenine_exchange : 1.0 adenine[ex] <=>
guanine_exchange : 1.0 guanine[ex] <=>
hypoxanthine_exchange : 1.0 hypoxanthine[ex] <=>
## CDIF630erm_02331; CDIF630erm_02961
adenine_transport : 1.0 Na+ + 1.0 adenine <=> 1.0 adenine[ex] + 1.0 Na+[ex]
guanine_transport : 1.0 Na+ + 1.0 guanine <=> 1.0 guanine[ex] + 1.0 Na+[ex]
hypoxanthine_transport : 1.0 Na+ + 1.0 hypoxanthine <=> 1.0 hypoxanthine[ex] + 1.0 Na+[ex]
##### uracil #####
uracil_exchange : 1.0 uracil[ex] <=>
## CDIF630erm_02848
uracil_transport : 1.0 Na+ + 1.0 uracil <=> 1.0 uracil[ex] + 1.0 Na+[ex]
##### xanthine/urate #####
xanthine_exchange : 1.0 xanthine[ex] <=>
urate_exchange : 1.0 urate[ex] <=>
## CDIF630erm_02298; CDIF630erm_02313; CDIF630erm_02314; CDIF630erm_03472
xanthine_transport : 1.0 Na+ + 1.0 xanthine <=> 1.0 xanthine[ex] + 1.0 Na+[ex]
urate_transport : 1.0 Na+ + 1.0 urate <=> 1.0 urate[ex] + 1.0 Na+[ex]
urate-degradation_1.17.1.4_RXN0-901 : 1.0 xanthine + 1.0 H2O + 1.0 NAD+ <=> 1.0 urate + 1.0 H+ + 1.0 NADH
##### other amino acids #####
asparagine_exchange : 1.0 L-asparagine[ex] <=> glutamine_exchange : 1.0 L-glutamine[ex] <=>
# unknown, ABC-transporter is a guess
## CDIF630erm_01972-CDIF630erm_01974?; CDIF630erm_00868-CDIF630erm_00870?
glutamine_transport : 1.0 H2O + 1.0 ATP + 1.0 L-glutamine[ex] -> 1.0 L-glutamine + 1.0 ADP + 1.0 phosphate + 1.0 H+
asparagine_transport : 1.0 H2O + 1.0 ATP + 1.0 L-asparagine[ex] -> 1.0 H+ + 1.0 phosphate + 1.0 ADP + 1.0 L-asparagine
##### 4-hydroxyproline #####
4-hydroxyproline_exchange : 1.0 trans-4-hydroxy-L-proline[ex] <=>
4-hydroxyproline_transport : 1.0 Na+ + 1.0 trans-4-hydroxy-L-proline <=> 1.0 Na+[ex] + 1.0 trans-4-hydroxy-L-proline[ex]
4-hydroxyproline-degr/1_manual_4.2.1.-_HD-Hyp : 1.0 trans-4-hydroxy-L-proline <=> 1.0 (S)-1-pyrroline-5-carboxylate + 1.0 H2O
```

```

4-hydroxyproline-degr/2_1.5.1.2_PYRROLINECARBREDUCT-RXN : 1.0 NADP+ + 1.0 L-proline <= 1.0
(S)-1-pyrroline-5-carboxylate + 1.0 NADPH + 2.0 H+
##### cystathionine #####
cystathionine_exchange : 1.0 L-cystathionine[ex] <=>
## CDIF630erm_02404-CDIF630erm_02406 vgl. Burguière et al. [47]
cystathionine_transport : 1.0 H2O + 1.0 ATP + 1.0 L-cystathionine[ex] -> 1.0 H+ + 1.0 phosphate + 1.0 ADP + 1.0
L-cystathionine
cystathionine-degr-A_4.4.1.8_RXN-15131 : 1.0 L-cystathionine -> 1.0 H+ + 1.0 2-aminoprop-2-enoate + 1.0
L-homocysteine
cystathionine-degr-B_4.4.1.1_RXN-14048 : 1.0 L-cystathionine -> 1.0 (2Z)-2-aminobut-2-enoate + 1.0 H+ + 1.0
L-cysteine
##### spermidine_exchange : 1.0 spermidine[ex] <=> #####
putrescine_exchange : 1.0 putrescine[ex] <=>
## CDIF630erm_01160-CDIF630erm_01163
putrescine_transport_3.6.3.31_modb_BS141431 : 1.0 ATP + 1.0 H2O + 1.0 putrescine[ex] -> 1.0 putrescine + 1.0 ADP +
1.0 phosphate + 1.0 H+
spermidine_transport_3.6.3.31_modb_BS141432 : 1.0 ATP + 1.0 H2O + 1.0 spermidine[ex] -> 1.0 spermidine + 1.0
phosphate + 1.0 ADP + 1.0 H+
##### 2,3-diaminopropanoate degradation #####
2,3-diaminopropanoate_exchange : 1.0 [23-Diaminopropanoate][ex] <=>
2,3-diaminopropanoate_transport : 1.0 ATP + 1.0 [23-Diaminopropanoate][ex] + 1.0 H2O -> 1.0 ADP + 1.0 phosphate +
1.0 [23-Diaminopropanoate] + 1.0 H+
2,3-diaminopropanoate-degr_4.3.1.15_4.3.1.15_RXN : 1.0 [23-Diaminopropanoate] + 1.0 H2O -> 2.0 ammonium + 1.0
pyruvate
hydroxylamine_exchange : 1.0 hydroxylamine[ex] <=>
hydroxylamine_transport : 1.0 hydroxylamine[ex] <=> 1.0 hydroxylamine
hydroxylamine_1.7.99.1_HYDROXYLAMINE-REDUCTASE-NADH-RXN : 1.0 H2O + 1.0 NAD+ + 1.0 ammonium <=> 2.0 H+ + 1.0 NADH +
1.0 hydroxylamine
##### ethanolamine utilization [48] #####
ethanolamine_exchange : 1.0 ethanolamine[ex] <=>
## CDIF630erm_02128
ethanolamine_transport1 : 1.0 ethanolamine <=> 1.0 ethanolamine[ex]
## CDIF630erm_02119
ethanolamine_transport2 : 1.0 ethanolamine[BMC] <= 1.0 ethanolamine
ethanolamine-utilization/1_4.3.1.7_ETHAMLY-RXN : 1.0 ethanolamine[BMC] -> 1.0 ammonium + 1.0 acetaldehyde[BMC]
ethanolamine-utilization/2_1.2.1.10_ACETALD-DEHYDROG-RXN : 1.0 NAD+[BMC] + 1.0 coenzyme_A[BMC] + 1.0
acetaldehyde[BMC] <=> 1.0 NADH[BMC] + 1.0 acetyl-CoA[BMC] + 1.0 H+
ethanolamine-utilization/3_2.3.1.8_PHOSACETYLTRANS-RXN : 1.0 acetyl-CoA[BMC] + 1.0 phosphate <=> 1.0
acetyl_phosphate + 1.0 coenzyme_A[BMC]
ethanolamine-utilization/4_1.1.1.1_ALCOHOL-DEHYDROGENASE-NADP+-RXN_WOP : 1.0 NAD+[BMC] + 1.0 ethanol <=> 1.0
NADH[BMC] + 1.0 acetaldehyde[BMC] + 1.0 H+
##### sn-glycerol-3-phosphate #####
sn-glycerol-3-phosphate_exchange : 1.0 sn-glycerol_3-phosphate[ex] <=> ## CDIF630erm_03719-CDIF630erm_03722
sn-glycerol-3-phosphate_transport : 1.0 ATP + 1.0 sn-glycerol_3-phosphate[ex] + 1.0 H2O -> 1.0 ADP + 1.0
sn-glycerol_3-phosphate + 1.0 phosphate + 1.0 H+
##### methylphosphonate degr II #####
methylphosphonate_exchange : 1.0 methylphosphonate[ex] <=>
## CDIF630erm_03847-CDIF630erm_03848
methylphosphonate_transport : 1.0 methylphosphonate + 1.0 ADP + 1.0 H+ <= 1.0 methylphosphonate[ex] + 1.0 ATP +
1.0 H2O
methane_transport : 1.0 methane <=> 1.0 methane[ex]
methane_exchange : 1.0 methane[ex] <=>
methylphosphonate-degr-II/1_2.7.8.37_RXNO-6732 : 1.0 ATP + 1.0 methylphosphonate -> 1.0 adenine + 1.0
alpha-D-ribose-1-methylphosphonate-5-triphosphate
methylphosphonate-degr-II/2_3.6.1.63_RXNO-6733 : 1.0 H2O + 1.0 alpha-D-ribose-1-methylphosphonate-5-triphosphate
-> 1.0 H+ + 1.0 diphosphate + 1.0 alpha-D-ribose-1-methylphosphonate_5-phosphate
methylphosphonate-degr-II/3_4.7.1.1_RXNO-6734 : 1.0 alpha-D-ribose-1-methylphosphonate_5-phosphate -> 1.0
5-phospho-alpha-D-ribose_1,2-cyclic_phosphate + 1.0 methane
methylphosphonate-degr-II/4_3.1.4.57_RXN-14995 : 1.0 H2O + 1.0 5-phospho-alpha-D-ribose_1,2-cyclic_phosphate ->
1.0 D-ribofuranose_2,5-bisphosphate + 1.0 H+
methylphosphonate-degr-II/5_3.1.4.57_RXN-14996 : 1.0 D-ribofuranose_2,5-bisphosphate + 1.0 H2O -> 1.0 phosphate +
1.0 D-ribose_5-phosphate
##### 2-aminoethylP degr I #####
2-aminoethylphosphonate_exchange : 1.0 (2-aminoethyl)phosphonate[ex] <=>
## CDIF630erm_03847-CDIF630erm_03848
2-aminoethylphosphonate_transport : 1.0 2-aminoethylphosphonate + 1.0 ADP + 1.0 H+ <= 1.0
(2-aminoethyl)phosphonate[ex] + 1.0 ATP + 1.0 H2O
2-aminoethylphosph-degr-I/1_2.6.1.37_2.6.1.37-RXN : 1.0 pyruvate + 1.0 (2-aminoethyl)phosphonate <=> 1.0
phosphonoacetaldehyde + 1.0 L-alanine

```

```

2-aminoethylphosph-degr-I/2_3.11.1.1_PHOSPHONOACETALDEHYDE-HYDROLASE-RXN : 1.0 phosphonoacetaldehyde + 1.0 H2O ->
1.0 acetaldehyde + 1.0 phosphate + 1.0 H+
##### phosphonoacetate degradation #####
phosphonoacetate_exchange : 1.0 phosphonoacetate[ex] <=>
## CDIF630erm_03847-CDIF630erm_03848
phosphonoacetate_transport : 1.0 phosphonoacetate + 1.0 ADP + 1.0 H+ + 1.0 phosphate <- 1.0 phosphonoacetate[ex] +
1.0 ATP + 1.0 H2O
phosphonoacetate-degradation_3.11.1.2_3.11.1.2-RXN : 1.0 H2O + 1.0 phosphonoacetate -> 1.0 acetate + 1.0 phosphate
+ 1.0 H+
#####succinate_exchange : 1.0 succinate[ex] <=> #####
## CDIF630erm_02583
succinate_transport : 1.0 Na+ + 1.0 succinate <=> 1.0 succinate[ex] + 1.0 Na+[ex]
##### tartronate semialdehyde #####
tartronate-semialdehyde_exchange : 1.0 tartronate-semialdehyde[ex] <=>
tartronate-semialdehyde_transport : 1.0 tartronate-semialdehyde[ex] + 1.0 Na+[ex] <=> 1.0 tartronate-semialdehyde +
1.0 Na+
tartronate-semialdehyde-degr_1.1.1.60_TSA-REDUCT-RXN_WOP : 1.0 NAD+ + 1.0 D-glycerate <=> 1.0 NADH + 1.0 H+ + 1.0
tartronate-semialdehyde
tartronate-semialdehyde-degr_1.1.1.60_TSA-REDUCT-RXN : 1.0 NADP+ + 1.0 D-glycerate <- 1.0 tartronate-semialdehyde +
1.0 H+ + 1.0 NADPH
##### Acetoin degradation #####
acetoin_exchange : 1.0 acetoin[ex] <=>
acetoin_transport : 1.0 acetoin[ex] + 1.0 H+[ex] <=> 1.0 acetoin + 1.0 H+
acetoin-degradation_2.3.1.190_RXN-9718 : 1.0 acetoin + 1.0 NAD+ + 1.0 coenzyme_A -> 1.0 acetyl-CoA + 1.0
acetaldehyde + 1.0 H+ + 1.0 NADH
##### 3-hydroxy-3-methylglutarate #####
3-hydroxy-3-methylglutarate_exchange : 1.0 3-hydroxy-3-methylglutarate[ex] <=>
## CDIF630erm_00917
3-hydroxy-3-methylglutarate_transport : 1.0 H+ + 1.0 3-hydroxy-3-methylglutarate <=> 1.0 H+[ex] + 1.0
3-hydroxy-3-methylglutarate[ex]
3-hydroxy-3-methylglutarate-degr/1_manual_2.8.3.-_HD-3MG : 1.0 acetyl-CoA + 1.0 3-hydroxy-3-methylglutarate -> 1.0
(S)-3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA + 1.0 acetate
3-hydroxy-3-methylglutarate-degr/2_4.1.3.4_HYDROXYMETHYLGLUTARYL-COA-LYASE-RXN : 1.0
(S)-3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA -> 1.0 acetyl-CoA + 1.0 acetoacetate
##### oxidized-GTP #####
hydroxyl-radical_exchange : 1.0 hydroxyl_radical[ex] <-
hydroxyl-radical_transport : 1.0 hydroxyl_radical[ex] -> 1.0 hydroxyl_radical
oxidized-GTP-and-dGTP-detoxification_spontaneous_RXN-11409 : 1.0 GTP + 2.0 hydroxyl_radical -> 1.0 8-oxo-GTP + 1.0
H2O
oxidized-GTP-and-dGTP-detoxification_spontaneous_RXN-11410 : 2.0 hydroxyl_radical + 1.0 dGTP -> 1.0 8-oxo-dGTP +
1.0 H2O
oxidized-GTP-and-dGTP-detoxification_3.6.1.55_RXN-11397 : 1.0 H2O + 1.0 8-oxo-GTP -> 1.0 8-oxo-GMP + 1.0
diphosphate + 1.0 H+
oxidized-GTP-and-dGTP-detoxification_3.6.1.55_RXN-11396 : 1.0 H2O + 1.0 8-oxo-dGTP -> 1.0 8-oxo-dGMP + 1.0
diphosphate + 1.0 H+
8-oxo-GMP_transport : 1.0 8-oxo-GMP[ex] <- 1.0 8-oxo-GMP
8-oxo-dGMP_transport : 1.0 8-oxo-dGMP[ex] <- 1.0 8-oxo-GMP
8-oxo-GMP_exchange : 1.0 8-oxo-GMP[ex] ->
8-oxo-dGMP_exchange : 1.0 8-oxo-dGMP[ex] ->
##### reactive oxygen detoxification #####
superoxide_exchange : 1.0 superoxide[ex] <-
hydrogen_peroxide_exchange : 1.0 hydrogen_peroxide[ex] <-
oxygen_exchange : 1.0 oxygen[ex] <-
methanol_exchange : 1.0 methanol[ex] <-
superoxide_transport : 1.0 superoxide <=> 1.0 superoxide[ex]
hydrogen_peroxide_transport : 1.0 hydrogen_peroxide <=> 1.0 hydrogen_peroxide[ex]
oxygen_transport : 1.0 oxygen <=> 1.0 oxygen[ex]
methanol_transport : 1.0 methanol <=> 1.0 methanol[ex]
superoxide-radicals-degr-A/1_1.15.1.1_SUPEROX-DISMUT-RXN : 2.0 H+ + 2.0 superoxide -> 1.0 hydrogen_peroxide + 1.0
oxygen
superoxide-radicals-degr-A/2a_1.11.1.6_CATAL-RXN : 2.0 hydrogen_peroxide -> 2.0 H2O + 1.0 oxygen
superoxide-radicals-degr-A/2b_1.11.1.6_RXN66-1 : 1.0 ethanol + 1.0 hydrogen_peroxide -> 1.0 acetaldehyde + 2.0 H2O
superoxide-radicals-degr-A/2c_moddir_1.11.1.6_RXN-14189 : 1.0 methanol + 1.0 hydrogen_peroxide <=> 1.0
formaldehyde + 2.0 H2O
superoxide-radicals-degr-B/1_1.15.1.2_1.15.1.2-RXN : 1.0 superoxide + 1.0 |Reduced-Rubredoxins| + 2.0 H+ <=> 1.0
|Oxidized-Rubredoxins| + 1.0 hydrogen_peroxide
superoxide-radicals-degr-B/2_manual_1.11.1.-_HD-1.11.1.- : 1.0 |Reduced-Rubredoxins| + 2.0 H+ + 1.0
hydrogen_peroxide <=> 1.0 |Oxidized-Rubredoxins| + 2.0 H2O
superoxide-radicals-degr-B/3_manual_1.4.-_HD-1.4.- : 2.0 L-glutamate + 1.0 |Oxidized-Rubredoxins| -> 1.0

```

```

L-glutamine + 1.0 2-oxoglutarate + 1.0 |Reduced-Rubredoxins| + 2.0 H+
oxygen-reduction-A_1.6.3._HD-1.6.3.- : 2.0 |Reduced-Rubredoxins| + 4.0 H+ + 1.0 oxygen -> 2.0
|Oxidized-Rubredoxins| + 2.0 H2O
oxygen-reduction-B_1.6.3.4_RXN-14692 : 2.0 H+ + 2.0 NADH + 1.0 oxygen -> 2.0 NAD+ + 2.0 H2O
formaldehyde-assimilation_spontaneous_2.1.2.11_RXN-2881 : 1.0 formaldehyde + 1.0 tetrahydropteroyl_tri-L-glutamate
-> 1.0 H2O + 1.0 5,10-methylene-tetrahydrofolate
##### cyanide detoxification I #####
cyanide_exchange : 1.0 hydrogen_cyanide[ex] <-
thiocyanate_exchange : 1.0 thiocyanate[ex] <-
cyanide_transport : 1.0 hydrogen_cyanide <=> 1.0 hydrogen_cyanide[ex]
thiocyanate_transport : 1.0 thiocyanate + 1.0 H+ <=> 1.0 thiocyanate[ex] + 1.0 H+[ex]
cyanide-detoxification-I/1_4.4.1.9_L-3-CYANOALANINE-SYNTHASE-RXN : 1.0 hydrogen_cyanide + 1.0 L-cysteine <=> 1.0
3-cyano-L-alanine + 1.0 hydrogen_sulfide + 1.0 H+
cyanide-detoxification-I/2a_3.5.5.4_3.5.5.4-RXN : 2.0 H2O + 1.0 3-cyano-L-alanine + 1.0 H+ -> 1.0 ammonium + 1.0
L-aspartate
cyanide-detoxification-I/2b_4.2.1.65_3.5.5.4_3-CYANOALANINE-HYDRATASE-RXN : 1.0 L-asparagine <- 1.0
3-cyano-L-alanine + 1.0 H+ + 1.0 H2O
# cyanide detoxification
cyanide-detoxification-III/1_2.8.1.2_R03105 : 1.0 sulfite + 1.0 3-mercaptopyruvate <=> 1.0 pyruvate + 1.0
thiosulfate
cyanide-detoxification-III/2_2.8.1.1_THIOSULFATE-SULFURTRANSFERASE-RXN : 1.0 thiosulfate + 1.0 hydrogen_cyanide ->
1.0 sulfite + 1.0 thiocyanate + 2.0 H+
# Cysteine degr III
L-cysteine-degradation-III/1_2.6.1.1_CYSTEINE-AMINOTRANSFERASE-RXN : 1.0 L-cysteine + 1.0 2-oxoglutarate <=> 1.0
3-mercaptopyruvate + 1.0 L-glutamate
L-cysteine-degradation-III/2_2.8.1.2_MERCAPYSTRANS-RXN : 1.0 hydrogen_cyanide + 1.0 3-mercaptopyruvate -> 1.0
thiocyanate + 1.0 H+ + 1.0 pyruvate
##### bile acids #####
taurochenodeoxycholate_exchange : 1.0 taurochenodeoxycholate[ex] <=>
chenodeoxycholate_exchange : 1.0 chenodeoxycholate[ex] <=>
taurocholate_exchange : 1.0 taurocholate[ex] <=>
cholate_exchange : 1.0 cholate[ex] <=>
## DIF630erm_02170
taurochenodeoxycholate_transport : 1.0 H+[ex] + 1.0 taurochenodeoxycholate[ex] <=> 1.0 H+ + 1.0
taurochenodeoxycholate
chenodeoxycholate_transport : 1.0 H+[ex] + 1.0 chenodeoxycholate[ex] <=> 1.0 H+ + 1.0 chenodeoxycholate
taurocholate_transport : 1.0 H+[ex] + 1.0 taurocholate[ex] <=> 1.0 H+ + 1.0 taurocholate
cholate_transport : 1.0 H+[ex] + 1.0 cholate[ex] <=> 1.0 H+ + 1.0 cholate
# C. difficile can degrade taurocholate and no glycocholate [49]
# => no EC 3.5.1.24; No sequences for EC 3.5.1.74 known
# Highest similarity to mouse enzyme. Mouse enzyme is taurine-specific [50]
# Reverse biosynthesis pathway
taurochenodeoxycholate-degr/1_2.3.1.65_RXN-9852 : 1.0 chenodeoxycholoyl-CoA + 1.0 taurine -> 1.0
taurochenodeoxycholate + 1.0 coenzyme_A + 1.0 H+
taurochenodeoxycholate-degr/2_3.1.2.2_RXN-14289 : 1.0 chenodeoxycholoyl-CoA + 1.0 H2O -> 1.0 coenzyme_A + 1.0
chenodeoxycholate + 1.0 H+
taurochenodeoxycholate-degr/3_manual_1.1.1._HD-ChChol : 1.0 chenodeoxycholate + 1.0 NADP+ -> 1.0
7-oxolithocholate + 1.0 NADPH + 1.0 H+
taurocholate-degr/1_moddir_2.3.1.65_RXN-9800 : 1.0 choloyl-CoA + 1.0 taurine <=> 1.0 coenzyme_A + 1.0 taurocholate
+ 1.0 H+
taurocholate-degr/2_manual_3.1.2.2_HD-3.1.2.2 : 1.0 choloyl-CoA + 1.0 H2O -> 1.0 coenzyme_A + 1.0 cholate + 1.0 H+
taurocholate-degr/3_manual_1.1.1._HD-Chol : 1.0 cholate + 1.0 NADP+ -> 1.0 7-oxodeoxycholate + 1.0 NADPH + 1.0 H+
7-oxodeoxycholate_transport : 1.0 7-oxodeoxycholate + 1.0 H+ -> 1.0 7-oxodeoxycholate[ex] + H+[ex]
7-oxolithocholate_transport : 1.0 7-oxolithocholate + 1.0 H+ -> 1.0 7-oxolithocholate[ex] + H+[ex]
taurine_transport : 1.0 taurine + 1.0 H+ -> 1.0 taurine[ex] + 1.0 H+[ex]
7-oxodeoxycholate_exchange : 1.0 7-oxodeoxycholate[ex] ->
7-oxolithocholate_exchange : 1.0 7-oxolithocholate[ex] ->
taurine_exchange : 1.0 taurine[ex] ->
##### choline degradation #####
choline_exchange : 1.0 choline[ex] <=>
choline_transport : 1.0 H+[ex] + 1.0 choline[ex] <=> 1.0 H+ + 1.0 choline
trimethylamine_exchange : 1.0 trimethylamine[ex] <=>
trimethylamine_transport : 1.0 H+[ex] + 1.0 trimethylamine[ex] <=> 1.0 H+ + 1.0 trimethylamine
choline-degradation-III_4.3.99.4_RXN-13946 : 1.0 choline -> 1.0 trimethylamine + 1.0 acetaldehyde
##### D-arabinose degr #####
D-arabinose_exchange : 1.0 D-arabinose[ex] <=>
## CDIF630erm_03311, CDIF630erm_03314; CDIF630erm_02563-CDIF630erm_02565
D-arabinose_transport_2.7.1.- : 1.0 D-arabinose[ex] + 1.0 |PTS-I-pi-phospho-L-histidines| -> 1.0
|PTS-I-Histidines| + 1.0 aldehydo-D-arabinose_5-phosphate

```

```
D-arabinose-degr_5.3.1.13_DARAB5PISOM-RXN : 1.0 aldehydo-D-arabinose_5-phosphate <=> 1.0 D-ribulose_5-phosphate
##### xylose degr I/ xylan degr #####
# set ratio for chain length
xylan_exchange : 1.0 |Xylans|[ex] <=>
xylose_exchange : 1.0 alpha-D-xylopyranose[ex] <=>
## CDIF630erm_03350-CDIF630erm_03353
xylan_transport : 1.0 |Xylans| <=> 1.0 |Xylans|[ex]
xylose_transport_2.7.1.- : 1.0 D-xylulose_5-phosphate + 1.0 |PTS-I-Histidines| <- 1.0 alpha-D-xylopyranose[ex] +
1.0 |PTS-I-pi-phospho-L-histidines|
xylan-degradation_3.2.1.177_RXN0-5001 : 1.0 |Xylans| + 1.0 H2O -> 1.0 alpha-D-xylopyranose
xylose-degradation-I/1_5.3.1.5_XYLISOM-RXN : 1.0 alpha-D-xylopyranose <=> 1.0 D-xylulose
xylose-degradation-I/2_2.7.1.17_XYLULOKIN-RXN : 1.0 ATP + 1.0 D-xylulose -> 1.0 ADP + 1.0 H+ + 1.0
D-xylulose_5-phosphate
##### galactose degradation I (Leloir-pathway) #####
galactose_exchange : 1.0 alpha-D-galactose[ex] <=>
## CDIF630erm_00408-CDIF630erm_00413; CDIF630erm_01218, CDIF630erm_01220-CDIF630erm_01222;
CDIF630erm_03576-CDIF630erm_03579?
galactose_transport_2.7.1.- : 1.0 alpha-D-galactose[ex] + 1.0 |PTS-I-pi-phospho-L-histidines| -> 1.0
|PTS-I-Histidines| + 1.0 alpha-D-galactose_1-phosphate
galactose-degr-I/1_2.7.7.12_GALACTURIDYLYLTRANS-RXN : 1.0 alpha-D-galactose_1-phosphate + 1.0 UDP-alpha-D-glucose
<=> 1.0 UDP-alpha-D-galactose + 1.0 alpha-D-glucopyranose_1-phosphate
galactose-degr-I/2_5.1.3.2_UDPGLUCEPIM-RXN : 1.0 UDP-alpha-D-glucose <=> 1.0 UDP-alpha-D-galactose
galactose-degr-I/3_spontaneous_RXN-10639 : 1.0 alpha-D-glucopyranose_1-phosphate <=> 1.0
beta-D-glucose_1-phosphate
##### xylitol degr A #####
xylitol_exchange : 1.0 xylitol[ex] <=>
# CDIF630erm_02563-CDIF630erm_02565
xylitol_transport : 1.0 |PTS-I-pi-phospho-L-histidines| + 1.0 xylitol[ex] -> 1.0 xylitol_5-phosphate + 1.0
|PTS-I-Histidines|
xylitol-degr_manual_1.1.1.-_HD-xy15 : 1.0 NAD+ + 1.0 xylitol_5-phosphate <=> 1.0 D-xylulose_5-phosphate + 1.0 NADH
+ 1.0 H+
# xylitol degr B
## CDIF630erm_02515-CDIF630erm_02517
xylitol_transport_2.7.1.- : 1.0 |PTS-I-pi-phospho-L-histidines| + 1.0 xylitol[ex] -> 1.0 xylitol_1-phosphate + 1.0
|PTS-I-Histidines|
xylitol-degr_manual_1.1.1.-_HD-xy11 : 1.0 NAD+ + 1.0 xylitol_1-phosphate <=> 1.0 D-xylulose_5-phosphate + 1.0 NADH
+ 1.0 H+
xylulose-degradation/1_5.1.3.4_RIBULPEPIM-RXN : 1.0 L-ribulose_5-phosphate <=> 1.0 D-xylulose_5-phosphate
##### arabitol degr #####
# arabitol degr
arabitol_exchange : 1.0 D-arabitol[ex] <=>
## CDIF630erm_02563 - CDIF630erm_02565
arabitol_transport : 1.0 |PTS-I-pi-phospho-L-histidines| + 1.0 D-arabitol[ex] -> 1.0 D-arabitol_1-phosphate + 1.0
|PTS-I-Histidines|
arabitol-degr_1.1.1.301_RXN-11106 : 1.0 D-arabitol_1-phosphate + 1.0 NAD+ <=> 1.0 H+ + 1.0 NADH + 1.0
D-xylulose_5-phosphate
##### ribitol degr #####
ribitol_exchange : 1.0 D-ribitol[ex] <=>
## CCDIF630erm_00620-CDIF630erm_00623
ribitol_transport_2.7.1.- : 1.0 |PTS-I-pi-phospho-L-histidines| + 1.0 D-ribitol[ex] -> 1.0 D-ribitol_5-phosphate +
1.0 |PTS-I-Histidines|
ribitol-degr_1.1.1.137_RIBITOL-5-PHOSPHATE-2-DEHYDROGENASE-RXN_WOP : 1.0 D-ribitol_5-phosphate + 1.0 NAD+ <=> 1.0
H+ + 1.0 D-ribulose_5-phosphate + 1.0 NADH
##### D-sorbitol degradation II #####
D-sorbitol_exchange : 1.0 D-sorbitol[ex] <=>
## CDIF630erm_00882-CDIF630erm_00885
D-sorbitol_transport_2.7.1.198 : 1.0 D-sorbitol[ex] + 1.0 |PTS-I-pi-phospho-L-histidines| -> 1.0
D-sorbitol_6-phosphate + 1.0 |PTS-I-Histidines|
D-sorbitol-degradation-II_1.1.1.140_SORB6PDEHYDROG-RXN : 1.0 NAD+ + 1.0 D-sorbitol_6-phosphate <=> 1.0
beta-D-fructofuranose_6-phosphate + 1.0 NADH + 1.0 H+
sorbitol-biosyn_1.1.1.17_BS257116 : 1.0 NAD+ + 1.0 D-sorbitol_6-phosphate <- 1.0 NADH + 1.0 H+ + 1.0
D-glucose_6-phosphate
##### mannitol degradation I #####
D-mannitol_exchange : 1.0 D-mannitol[ex] <=>
## CDIF630erm_02571, CDIF630erm_02573
mannitol_transport_2.7.1.197 : 1.0 |PTS-I-pi-phospho-L-histidines| + 1.0 D-mannitol[ex] -> 1.0
D-mannitol_1-phosphate + 1.0 |PTS-I-Histidines|
mannitol-degradation-I_1.1.1.17_MANNPDEHYDROG-RXN : 1.0 NAD+ + 1.0 D-mannitol_1-phosphate <=> 1.0 NADH + 1.0 H+ +
1.0 beta-D-fructofuranose_6-phosphate
```

```
##### D-ribofuranose and 2'-deoxyribose degr C #####
D-riboseexchange : 1.0 beta-D-ribose[ex] <=>
2'-deoxyriboseexchange : 1.0 2'-deoxyribose[ex] <=>
## CDIF630erm_00425-CDIF630erm_00427
D-ribosetransport : 1.0 ATP + 1.0 H2O + 1.0 beta-D-ribose[ex] -> 1.0 ADP + 1.0 phosphate + 1.0 H+ +
1.0 beta-D-ribose
2'-deoxyribosetransport : 1.0 ATP + 1.0 H2O + 1.0 2'-deoxyribose[ex] -> 1.0 ADP + 1.0 phosphate + 1.0 H+ + 1.0
2'-deoxyribose
2'-deoxyribose-degradation_2.7.1.15_RXN-14223 : 1.0 2'-deoxyribose + 1.0 ATP -> 1.0 H+ + 1.0 ADP + 1.0
2-deoxy-D-ribose_5-phosphate
##### maltose degradation #####
maltoseexchange : 1.0 alpha-maltose[ex] <=>
## CDIF630erm_00981-CDIF630erm_00983;CDIF630erm_02759, CDIF630erm_02761; CDIF630erm_03341, CDIF630erm_03344
maltosetransport_2.7.1.208 : 1.0 alpha-maltose[ex] + 1.0 |PTS-I-pi-phospho-L-histidines| -> 1.0
alpha-maltose_6'-phosphate + 1.0 |PTS-I-Histidines|
maltose-degr_3.2.1.122_MALTOSE-6-PHOSPHATE-GLUCOSIDASE-RXN : 1.0 H2O + 1.0 alpha-maltose_6'-phosphate -> 1.0
D-glucose + 1.0 D-glucose_6-phosphate
##### sucrose degradation I #####
sucroseexchange : 1.0 sucrose[ex] <=>
## CDIF630erm_00597
sucrosetransport : 1.0 |PTS-I-pi-phospho-L-histidines| + 1.0 sucrose[ex] -> 1.0 sucrose_6-phosphate + 1.0
|PTS-I-Histidines|
sucrose-degradation-I/1.3.2.1.B3_BR49793 : 1.0 sucrose_6-phosphate + 1.0 H2O -> 1.0 beta-D-fructofuranose + 1.0
alpha-D-glucose_6-phosphate
sucrose-degradation-I/2a_2.7.1.4_FRUCTOKINASE-RXN : 1.0 ATP + 1.0 beta-D-fructofuranose -> 1.0 ADP + 1.0
beta-D-fructofuranose_6-phosphate + 1.0 H+
sucrose-degradation-I/2b_5.3.1.5_BS1055 : 1.0 D-glucose <- 1.0 beta-D-fructofuranose
glucose-iso_5.3.1.9_R02740 : 1.0 alpha-D-glucose_6-phosphate <=> 1.0 beta-D-fructofuranose_6-phosphate
glucose-iso_5.1.3.15_5.3.1.9_spontaneous_GLUCOSE-6-PHOSPHATE-1-EPIMERASE-RXN : 1.0 alpha-D-glucose_6-phosphate <=>
1.0 beta-D-glucose_6-phosphate
##### D-tagatose degradation #####
D-tagatoseexchange : 1.0 D-tagatose[ex] <=>
## CDIF630erm_03358
D-tagatosetransport : 1.0 D-tagatose[ex] + 1.0 |PTS-I-pi-phospho-L-histidines| -> 1.0 |PTS-I-Histidines| + 1.0
D-tagatose_1-phosphate
# CDIF630erm_03359
D-tagatose-degr/1_manual_2.7.1.-_HD-tag : 1.0 D-tagatose_1-phosphate + 1.0 ATP -> 1.0 H+ + 1.0 ADP + 1.0
D-tagatofuranose_1,6-bisphosphate
D-tagatose-degr/4.1.2.40_TAGAALDOL-RXN : 1.0 D-tagatofuranose_1,6-bisphosphate <=> 1.0
D-glyceraldehyde_3-phosphate + 1.0 glyceraldehyde_3-phosphate
##### fructose degr #####
D-fructofuranoseexchange : 1.0 beta-D-fructofuranose[ex] <=>
## CDIF630erm_02503
fructosetransport_2.7.1.202 : 1.0 |PTS-I-pi-phospho-L-histidines| + 1.0 beta-D-fructofuranose[ex] -> 1.0
beta-D-fructofuranose_1-phosphate + 1.0 |PTS-I-Histidines|
fructose-degradation_2.7.1.56_1PFRUCTOPHOSN-RXN : 1.0 beta-D-fructofuranose_1-phosphate + 1.0 ATP -> 1.0 ADP + 1.0
fructose_1,6-bisphosphate + 1.0 H+
##### alternative 1-deoxy-D-xylulose_5-phosphate biosynthesis #####
1-deoxy-D-xylulose_5-phosphate-biosyn/1.4.1.2.13_RXN-8631 : 1.0 beta-D-fructofuranose_1-phosphate -> 1.0
D-glyceraldehyde + 1.0 glyceraldehyde_3-phosphate
1-deoxy-D-xylulose_5-phosphate-biosyn/2a_1.2.1.3_BS426217 : 1.0 D-glyceraldehyde + 1.0 NAD+ + 1.0 H2O <=> 1.0 NADH
+ 1.0 D-glycerate + 1.0 H+
1-deoxy-D-xylulose_5-phosphate-biosyn/2b_2.2.1.7_BS260855 : 1.0 D-glyceraldehyde + 1.0 pyruvate -> 1.0 CO2 + 1.0
1-deoxy-D-xylulose
1-deoxy-D-xylulose_5-phosphate-biosyn/3_2.7.1.17_RXN0-382 : 1.0 1-deoxy-D-xylulose + 1.0 ATP -> 1.0 ADP + 1.0
1-deoxy-D-xylulose_5-phosphate + 1.0 H+
##### cellobiose degr C #####
D-cellobioseexchange : 1.0 beta-D-cellobiose[ex] <=>
## CDIF630erm_03148; CDIF630erm_03151; CDIF630erm_03151
cellobiosetransport_2.7.1.205 : 1.0 beta-D-cellobiose[ex] + 1.0 |PTS-I-pi-phospho-L-histidines| -> 1.0
6-phospho-beta-D-glucosyl-(1,4)-D-glucose + 1.0 |PTS-I-Histidines|
cellobiose-degr_3.2.1.86_6-PHOSPHO-BETA-GLUCOSIDASE-RXN : 1.0 6-phospho-beta-D-glucosyl-(1,4)-D-glucose + 1.0 H2O
-> 1.0 D-glucose + 1.0 D-glucose_6-phosphate
##### chitobiose degradation #####
chitobioseexchange : 1.0 N,N'-diacetylchitobiose[ex] <=>
## CDIF630erm_03148; CDIF630erm_03151; CDIF630erm_03151
chitobiosetransport_2.7.1.196 : 1.0 N,N'-diacetylchitobiose[ex] + 1.0 |PTS-I-pi-phospho-L-histidines| -> 1.0
|PTS-I-Histidines| + 1.0 N,N'-diacetylchitobiose_6'-phosphate
chitobiose-degradation_3.5.1.105_RXN0-7001 : 1.0 H2O + 1.0 N,N'-diacetylchitobiose_6'-phosphate -> 1.0 acetate +
```



```
1.0 N-monoacetylchitobiose_6'-phosphate
chitobiose-degradation_3.2.1.86_RXN0-7002 : 1.0 H2O + 1.0 N-monoacetylchitobiose_6'-phosphate -> 1.0
N-acetyl-D-glucosamine_6-phosphate + 1.0 D-glucosamine
# assumed to be side reaction of 2.7.1.59
chitobiose-degradation_2.7.1.59_GLUCOSAMINE-KINASE-RXN : 1.0 D-glucosamine + 1.0 ATP -> 1.0
D-glucosamine_6-phosphate + 1.0 ADP + 1.0 H+
##### trehalose degr I #####
trehalose_exchange : 1.0 alpha,alpha-trehalose[ex] <=>
# CDIF630erm_03371-CDIF630erm_03372?
trehalose_transport : 1.0 |PTS-I-pi-phospho-L-histidines| + 1.0 alpha,alpha-trehalose[ex] -> 1.0
|PTS-I-Histidines| + 1.0 alpha,alpha-trehalose_6-phosphate
trehalose-degr-I_3.2.1.122_3.2.1.93_TRE6PHYDRO-RXN : 1.0 alpha,alpha-trehalose_6-phosphate + 1.0 H2O -> 1.0
D-glucose_6-phosphate + 1.0 D-glucose
##### sugars polymers #####
cyclodextrin_exchange : 1.0 |Cyclodextrins|[ex] <=>
starch_exchange : 1.0 |Starch|[ex] <=>
maltodextrin_exchange : 1.0 |Maltodextrin|[ex] <=>
pullulan_exchange : 1.0 |Pullulans|[ex] <=>
maltotriose_exchange : 1.0 maltotriose[ex] <=>
cyclodextrin-degr_3.2.1.54_CYCLOMALTODEXTRINASE-RXN : 1.0 H2O + 1.0 |Cyclodextrins|[ex] -> 1.0 |Maltodextrins|[ex]
starch-degr_manual_2.4.1.18_3.2.1.41_3.2.1.1_HD-starch : 1.0 |Starch|[ex] + 1.0 H2O[ex] -> 1.0 |Maltodextrins|[ex]
maltodextrin-degr_3.2.1.133_3.2.1.1_RXN-12188 : 1.0 |Maltodextrins|[ex] + 1.0 H2O[ex] -> 1.0 D-glucose[ex] + 1.0
alpha,alpha-trehalose[ex]
pullulan-degr_3.2.1.54_3.2.1.41_RXN-12302 : 1.0 |Pullulans|[ex] + 1.0 H2O[ex] -> 2.0 maltotriose[ex]
maltotriose-degr_modnames_3.2.1.10_R06199 : 2.0 H2O + 1.0 maltotriose[ex] -> 3.0 D-glucose[ex]
##### N-acetylneuraminate and N-acetylmannosamine degradation #####
N-acetylneuraminate_exchange : 1.0 N-acetylneuraminate[ex] <=>
## CDIF630erm_02472
N-acetylneuraminate_transport : 1.0 N-acetyl-beta-neuraminate + 1.0 Na+ <=> 1.0 N-acetylneuraminate[ex] + 1.0
Na+[ex]
N-acetylneur-degr/1_4.1.3.3_ACNEULY-RXN : 1.0 N-acetyl-beta-neuraminate <=> 1.0 |N-acetyl-D-mannosamine| + 1.0
pyruvate
N-acetylneur-degr/2_2.7.1.59_NANK-RXN : 1.0 ATP + 1.0 |N-acetyl-D-mannosamine| -> 1.0 ADP + 1.0
N-acetyl-D-mannosamine_6-phosphate + 1.0 H+
N-acetylneur-degr/3_5.1.3.9_NANE-RXN : 1.0 N-acetyl-D-mannosamine_6-phosphate <=> 1.0
N-acetyl-D-glucosamine_6-phosphate
##### D-galactosamine and N-acetyl-D-galactosamine degradation #####
N-acetyl-D-galactosamine_exchange : 1.0 |N-acetyl-D-galactosamine|[ex] <=>
D-galactosamine_exchange : 1.0 D-galactosamine[ex] <=>
## CDIF630erm_00408-CDIF630erm_00413; CDIF630erm_01218, CDIF630erm_01220-CDIF630erm_01222;
CDIF630erm_03576-CDIF630erm_03579?
N-acetyl-D-galactosamine_transport : 1.0 |PTS-I-pi-phospho-L-histidines| + 1.0 |N-acetyl-D-galactosamine| -> 1.0
|PTS-I-Histidines| + 1.0 N-acetyl-D-galactosamine_6-phosphate
D-galactosamine_transport : 1.0 D-Galactosamine[ex] + 1.0 |PTS-I-pi-phospho-L-histidines| -> 1.0
D-galactosamine_6-phosphate + 1.0 |PTS-I-Histidines|
(N-acetyl-)D-galactosamine-degr/1_3.5.1.25_3.5.1.80-RXN : 1.0 N-acetyl-D-galactosamine_6-phosphate + 1.0 H2O ->
1.0 acetate + 1.0 D-galactosamine_6-phosphate
(N-acetyl-)D-galactosamine-degr/2_5.3.1.-_RXN-13548 : 1.0 D-galactosamine_6-phosphate + 1.0 H2O -> 1.0 ammonium +
1.0 D-tagatofuranose_6-phosphate
(N-acetyl-)D-galactosamine-degr/3_2.7.1.11_2.7.1.144_2.7.1.56_TAGAKIN-RXN : 1.0 D-tagatofuranose_6-phosphate + 1.0
ATP -> 1.0 ADP + 1.0 H+ + 1.0 D-tagatofuranose_1,6-bisphosphate
##### D-glucosamine degradation #####
D-glucosamine_exchange : 1.0 D-glucosamine[ex] <=>
## CDIF630erm_00408-CDIF630erm_00413; CDIF630erm_01218, CDIF630erm_01220-CDIF630erm_01222;
CDIF630erm_03576-CDIF630erm_03579?
D-glucosamine_transport : 1.0 |PTS-I-pi-phospho-L-histidines| + 1.0 D-glucosamine[ex] -> 1.0
D-glucosamine_6-phosphate + 1.0 |PTS-I-Histidines|
D-glucosamine-degr/1_4.3.1.29_RXN-14730 : 1.0 D-glucosamine_6-phosphate -> 1.0 ammonium + 1.0
2-dehydro-3-deoxy-D-gluconate_6-phosphate
D-glucosamine-degr/2_2.7.1.45_DEOXYGLUCONOKIN-RXN : 1.0 2-dehydro-3-deoxy-D-gluconate + 1.0 ATP -> 1.0 ADP + 1.0
2-dehydro-3-deoxy-D-gluconate_6-phosphate + 1.0 H+
D-glucosamine-degr/3_4.1.2.14_KDPGALDOL-RXN : 1.0 2-dehydro-3-deoxy-D-gluconate_6-phosphate -> 1.0 pyruvate +
1.0 D-glyceraldehyde_3-phosphate
##### 2-0-alpha-mannosyl-D-glycerate degradation C #####
2-0-alpha-mannosyl-D-glycerate_exchange : 1.0 2-0-alpha-mannosyl-D-glycerate[ex] <=>
## CDIF630erm_03369; CDIF630erm_02819-CDIF630erm_02821
2-0-alpha-mannosyl-D-glycerate_transport_2.7.1.195 : 1.0 2-0-alpha-mannosyl-D-glycerate[ex] + 1.0
|PTS-I-pi-phospho-L-histidines| -> 1.0 2-0-(6-phospho-alpha-D-mannosyl)-D-glycerate + 1.0 |PTS-I-Histidines|
2-0-alpha-mannosyl-D-glycerate-degr_3.2.1.170_RXN0-5216 : 1.0 2-0-(6-phospho-alpha-D-mannosyl)-D-glycerate + 1.0
```

```

H2O -> 1.0 D-glycerate + 1.0 D-mannopyranose_6-phosphate
##### altronate and 2-dehydro-3-deoxy-D-gluconate degradation #####
D-altronate_exchange : 1.0 D-altronate <=>
2-dehydro-3-deoxy-D-gluconate_exchange : 1.0 2-dehydro-3-deoxy-D-gluconate <=>
## CDIF630erm_03138
2-dehydro-3-deoxy-D-gluconate_transport : 1.0 2-dehydro-3-deoxy-D-gluconate + 1.0 Na+ <=> 1.0
2-dehydro-3-deoxy-D-gluconate[ex] + 1.0 Na+[ex]
D-altronate_transport : 1.0 D-altronate + 1.0 Na+ <=> 1.0 D-altronate[ex] + 1.0 Na+[ex]
D-altronate-degr_4.2.1.7_ALTRODEHYDRAT-RXN : 1.0 D-altronate -> 1.0 H2O + 1.0 2-dehydro-3-deoxy-D-gluconate
#####riboflavin_exchange : 1.0 riboflavin[ex] <=> #####
## CDIF630erm_00266
riboflavin_transport : 1.0 H2O + 1.0 ATP + 1.0 riboflavin[ex] -> 1.0 H+ + 1.0 phosphate + 1.0 ADP + 1.0 riboflavin
##### adenosylcobalamin salvage from cobinamide #####
cobinamide_exchange : 1.0 cobinamide[ex] <=>
coenzyme-B12_exchange : 1.0 adenosylcobalamin[ex] <=>
coenzyme-B12_transport_3.6.3.33 : 1.0 ATP + 1.0 adenosylcobalamin[ex] + 1.0 H2O -> 1.0 ADP + 1.0 phosphate + 1.0
adenosylcobalamin + 1.0 H+
cobinamide_transport_3.6.3.33 : 1.0 ATP + 1.0 cobinamide[ex] + 1.0 H2O -> 1.0 ADP + 1.0 phosphate + 1.0 cobinamide
+ 1.0 H+
adenosylcobalamin-salvage-from-cobinamide/1.2.5.1.17_BTUR2-RXN : 1.0 ATP + 1.0 cobinamide -> 1.0
adenosylcobinamide + 1.0 PPi
adenosylcobalamin-salvage-from-cobinamide/2.2.7.1.156_COBINAMIDEKIN-RXN : 1.0 adenosylcobinamide + 1.0 ATP -> 1.0
ADP + 1.0 adenosyl-cobinamide_phosphate + 1.0 H+
##### dethiobiotin #####
dethiobiotin_exchange : 1.0 dethiobiotin[ex] <=>
## CDIF630erm_03256
dethiobiotin_transport : 1.0 ATP + 1.0 dethiobiotin[ex] + 1.0 H2O -> 1.0 ADP + 1.0 phosphate + 1.0 dethiobiotin +
1.0 H+
biotin-biosynthesis_2.8.1.7_RXN-12588 : 1.0 |Unsulfurated-Sulfur-Acceptors| + 1.0 L-cysteine -> 1.0
|Sulfurated-Sulfur-Acceptors| + 1.0 L-alanine
biotin-biosynthesis_modnames_2.8.1.6_2.8.1.6-RXN : 1.0 |Sulfurated-Sulfur-Acceptors| + 2.0 |Reduced-Ferredoxins|
+ 2.0 S-adenosyl-L-methionine + 1.0 dethiobiotin -> 2.0 L-methionine + 2.0 5'-deoxyadenosine + 1.0 biotin + 1.0
|Unsulfurated-Sulfur-Acceptors| + 2.0 |Oxidized-Ferredoxins|
##### formylaminopyrimidine #####
formylaminopyrimidine_exchange : 1.0 formylaminopyrimidine[ex] <=>
formylaminopyrimidine_transport : 1.0 ATP + 1.0 formylaminopyrimidine[ex] + 1.0 H2O -> 1.0 ADP + 1.0 phosphate +
1.0 formylaminopyrimidine + 1.0 H+
base-degraded-thiamine-salvage_3.5.1.-RXN-12612 : 1.0 formylaminopyrimidine + 1.0 H2O -> 1.0
aminomethylpyrimidine + 1.0 formate
base-degraded-thiamine-salvage_3.5.99.2_RXN-12613 : 1.0 H2O + 1.0 aminomethylpyrimidine -> 1.0
4-amino-2-methyl-5-pyrimidinemethanol + 1.0 ammonium
##### sulfolactate #####
sulfolactate_exchange : 1.0 (2R)-3-sulfolactate <=>
## CDIF630erm_03289
sulfolactate_transport : 1.0 (2R)-3-sulfolactate + 1.0 Na+ <=> 1.0 (2R)-3-sulfolactate[ex] + 1.0 Na+[ex]
sulfolactate-degr/1.4.4.1.24_RXN-11691 : 1.0 (2R)-3-sulfolactate -> 1.0 H+ + 1.0 pyruvate + 1.0 sulfite
sulfolactate-degr/2_spontaneous_RXN-8315 : 1.0 H+ + 1.0 sulfite <=> 1.0 hydrogen_sulfite
##### cyclic_di-3',5'-guanylate #####
cGDP_2.7.7.65_RXN0-5359 : 2.0 GTP -> 2.0 diphosphate + 1.0 cyclic_di-3',5'-guanylate
cGDP_3.1.4.52_RXN0-4181 : 1.0 H2O + 1.0 cyclic_di-3',5'-guanylate -> 1.0 H+ + 1.0 linear_dimeric_GMP
##### Reactions without pathway #####
no-pathway_1.1.1.1_RXN-6021 : 1.0 NAD+ + 1.0 choline -> 1.0 NADH + 1.0 betaine_aldehyde + 1.0 H+
no-pathway_1.1.1.1_RXN-12582 : 1.0 choline + 1.0 NADP+ <=> 1.0 betaine_aldehyde + 1.0 NADPH + 1.0 H+
no-pathway_1.1.1.22_UGD-RXN : 2.0 NAD+ + 1.0 UDP-alpha-D-glucose + 1.0 H2O -> 1.0 UDP-alpha-D-glucuronate + 3.0 H+
+ 2.0 NADH
no-pathway_1.2.1.3_RXN-4142 : 1.0 H2O + 1.0 NAD+ + 1.0 |Fatty-Aldehydes| -> 1.0 |Fatty-Acids| + 2.0 H+ + 1.0 NADH
no-pathway_1.2.1.3_AMINOBUTDEHYDROG-RXN : 1.0 NAD+ + 1.0 4-aminobutanal + 1.0 H2O -> 1.0 4-aminobutanoate + 2.0 H+
+ 1.0 NADH
no-pathway_1.1.1.86_R04440 : 1.0 (2R)-2,3-dihydroxy-3-methylbutanoate + 1.0 NADP+ <=> 1.0 NADPH + 1.0 H+ + 1.0
3-hydroxy-3-methyl-2-oxobutanoate
no-pathway_1.5.1.49_PYRROLINE-2-CARBOXYLATE-REDUCTASE-RXN : 1.0 L-proline + 1.0 NADP+ <- 2.0 H+ + 1.0
1-pyrroline-2-carboxylate + 1.0 NADPH
no-pathway_1.5.1.49_PYRROLINE-2-CARBOXYLATE-REDUCTASE-RXN_WOP : 1.0 L-proline + 1.0 NAD+ <=> 2.0 H+ + 1.0 NADH +
1.0 1-pyrroline-2-carboxylate
no-pathway_1.8.1.14_COA-DISULFIDE-REDUCTASE-NADH-RXN : 1.0 NADP+ + 2.0 coenzyme_A <=> 1.0 CoA-disulfide + 1.0 H+ +
1.0 NADPH
no-pathway_2.1.1.79_2.1.1.79-RXN : 1.0 S-adenosyl-L-methionine + 1.0 |Phospholipid-Olefinic-Fatty-Acids| -> 1.0 H+
+ 1.0 S-adenosyl-L-homocysteine + 1.0 |Phospholipid-Cyclopropane-Fatty-Acids|
no-pathway_2.3.1.181_RXN0-947 : 1.0 |Octanoyl-ACPs| + 1.0 |Lipoyl-Protein-L-Lysine| -> 1.0 |Octanoylated-domains| +

```

1.0 Acyl-carrier\_protein + 1.0 H+  
no-pathway\_2.3.1.79\_MALTACETYLTRAN-RXN : 1.0 acetyl-CoA + 1.0 alpha,alpha-trehalose <=> 1.0 coenzyme\_A + 1.0  
6-O-acetyl-alpha-D-glucopyranosyl-(1arr4)-D-glucose  
no-pathway\_2.5.1.17\_COBALADENOSYLTRANS-RXN : 1.0 cob(I)alamin + 1.0 ATP -> 1.0 adenosylcobalamin + 1.0 PPPi  
no-pathway\_2.5.1.49\_0-ACETYLHOMOSERINE-THIOL-LYASE-RXN : 1.0 methanethiol + 1.0 0-acetyl-L-homoserine -> 1.0  
acetate + 1.0 L-methionine + 1.0 H+  
no-pathway\_2.7.1.33\_PANTETHEINE-KINASE-RXN : 1.0 pantetheine + 1.0 ATP -> 1.0 ADP + 1.0 4'-phosphopantetheine +  
1.0 H+  
no-pathway\_2.7.1.33\_R04391 : 1.0 ATP + 1.0 N-[(R)-pantothenoyl]-L-cysteine -> 1.0  
R-4'-phosphopantothenoyl-L-cysteine + 1.0 ADP  
no-pathway\_2.7.1.49\_2.7.1.35\_PYRAMKIN-RXN : 1.0 pyridoxamine + 1.0 ATP -> 1.0 H+ + 1.0 ADP + 1.0  
pyridoxamine\_5'-phosphate  
no-pathway\_2.7.1.35\_PYRIDOXKIN-RXN : 1.0 pyridoxal + 1.0 ATP -> 1.0 H+ + 1.0 ADP + 1.0 pyridoxal\_5'-phosphate  
no-pathway\_2.7.1.66\_UNDECAPRENOL-KINASE-RXN : 1.0 di-trans,octa-cis-undecaprenol + 1.0 ATP -> 1.0 ADP + 1.0  
di-trans,octa-cis-undecaprenyl\_phosphate + 1.0 H+  
no-pathway\_2.7.7.85\_RXN-14338 : 2.0 ATP <=> 1.0 cyclic\_di-3',5'-adenylate + 2.0 diphosphate  
no-pathway\_2.7.8.40\_RXN-14571 : 1.0 di-trans,octa-cis-undecaprenyl\_phosphate + 1.0  
UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine <=> 1.0 N-acetyl-alpha-D-galactosaminyl-diphospho-ditrans,octacis-undecaprenol +  
1.0 UMP  
no-pathway\_2.7.8.7\_HOLO-ACP-SYNTH-RXN : 1.0 |apo-ACP| + 1.0 coenzyme\_A -> 1.0 adenosine\_3',5'-bisphosphate + 1.0  
Acyl-carrier\_protein + 1.0 H+  
photorespiration\_3.1.3.18\_GPH-RXN : 1.0 H2O + 1.0 2-phosphoglycolate -> 1.0 glycolate + 1.0 phosphate  
no-pathway\_3.1.4.46\_RXN-14073 : 1.0 glycerophosphoglycerol + 1.0 H2O -> 1.0 sn-glycerol\_3-phosphate + 1.0 glycerol  
+ 1.0 H+  
no-pathway\_3.2.1.10\_3.2.1.10-RXN : 1.0 beta-isomaltose + 1.0 H2O -> 2.0 D-glucose  
no-pathway\_3.2.1.133\_3.2.1.133-RXN : 1.0 H2O + 1.0 |Starch| -> 1.0 alpha-maltose  
no-pathway\_3.2.1.37\_3.2.1.37-RXN : 1.0 H2O + 1.0 |1-4-D-xylooligosaccharides| -> 1.0 beta-D-xylopyranose  
no-pathway\_3.6.1.13\_RXN0-1441 : 1.0 H2O + 1.0 ADP-D-ribose -> 2.0 H+ + 1.0 AMP + 1.0 D-ribose\_5-phosphate  
lactate-biosynthesis\_fucose-degradation\_4.1.2.17\_FUCPALDOL-RXN : 1.0 L-fucose\_1-phosphate <=> 1.0  
(S)-lactaldehyde + 1.0 glycerone\_phosphate  
no-pathway\_4.1.3.16\_RXN-13990 : 1.0 (4S)-4-hydroxy-2-oxoglutarate <=> 1.0 glyoxylate + 1.0 pyruvate  
no-pathway\_5.1.1.13\_ASPARTATE-RACEMASE-RXN : 1.0 L-aspartate <=> 1.0 D-aspartate  
no-pathway\_5.1.1.21\_RXN-16430 : 1.0 L-isoleucine <=> 1.0 D-allo-isoleucine  
metabolism-of-biosynthesis\_5.1.3.14\_UDPGLCNACEPIM-RXN : 1.0 UDP-N-acetyl-alpha-D-glucosamine <=> 1.0  
UDP-N-acetyl-alpha-D-mannosamine  
no-pathway\_5.4.3.9\_RXN-13569 : 1.0 L-glutamate <=> 1.0 beta-glutamate  
no-pathway\_6.1.1.13\_6.1.1.13-RXN : 1.0 ATP + 1.0 Poly(ribitol\_phosphate) + 1.0 D-alanine -> 1.0 H+ + 1.0  
diphosphate + 1.0 0-D-Alanyl-poly(ribitol\_phosphate) + 1.0 AMP  
##### Genric #####  
no-pathway\_1.1.3.15\_S-2-HYDROXY-ACID-OXIDASE-RXN : 1.0 oxygen + 1.0 |S-2-Hydroxyacids| -> 1.0 hydrogen\_peroxide +  
1.0 |2-Oxo-carboxylates|  
no-pathway\_1.11.1.15\_RXN0-5468 : 1.0 |Red-Thioredoxin| + 1.0 |Alkyl-Hydro-Peroxides| -> 1.0 |Alcohols| + 1.0 H2O +  
1.0 |Ox-Thioredoxin|  
no-pathway\_1.2.1.3\_ALDHDEHYDROG-RXN : 1.0 |Aldehydes| + 1.0 H2O + 1.0 NAD+ -> 1.0 NADH + 1.0 |Carboxylates| + 2.0  
H+  
no-pathway\_3.1.1.96\_RXN-15041 : 1.0 |D-aminoacyl-tRNAs| + 1.0 H2O -> 1.0 |tRNAs| + 2.0 H+ + 1.0 |D-Amino-Acids|  
no-pathway\_3.5.1.3\_OMEGA-AMIDASE-RXN : 1.0 DICARBOXYLIC-ACID-MONOAMIDES + 1.0 H2O -> 1.0 ammonium + 1.0  
|dicarboxylate|  
no-pathway\_3.5.1.81\_3.5.1.81-RXN : 1.0 N-Acyl-D-amino\_acid + 1.0 H2O -> 1.0 |Carboxylates| + 1.0 |D-Amino-Acids|  
no-pathway\_3.5.1.87\_3.5.1.87-RXN : 1.0 H2O + 2.0 H+ + 1.0 |N-Carbamoyl-L-Amino-Acids| -> 1.0 ammonium + 1.0  
|L-Amino-Acids| + 1.0 CO2  
no-pathway\_5.5.1.6\_CHALCONE-ISOMERASE-RXN : 1.0 |Chalcones| <=> 1.0 flavanone

## Literaturverzeichnis

- [1] E. van Eijk, S. Y. Anvar, H. P. Browne, W. Y. Leung, J. Frank, A. M. Schmitz, A. P. Roberts und W. K. Smits. „Complete genome sequence of the *Clostridium difficile* laboratory strain 630 $\Delta$ *erm* reveals differences from strain 630, including translocation of the mobile element CTn5“. *BMC Genomics* 16.1 (2015), 31.
- [2] F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham und M. Schaechter. *Physiology of the Bacterial Cell. A Molecular Approach*. Sunderland: Sinauer Associates, 1990.
- [3] M. A. Machnicka, K. Milanowska, O. O. Oglou, E. Purta, M. Kurkowska *et al.* „MODO-MICS: a database of RNA modification pathways—2013 update“. *Nucleic Acids Res.* 41.D (2012), D262–D267.
- [4] D. B. Drucker, H. M. Wardle und V. Boote. „Phospholipid Profiles of *Clostridium difficile*“. *J. Bacteriol.* 178.19 (1996), 5844–5846.
- [5] S. R. Elsdén, M. G. Hilton, K. R. Parsley und R. Self. „The Lipid Fatty Acids of Proteolytic Clostridia“. *J. Gen. Microbiol.* 118.1 (1980), 115–123.
- [6] C. W. Reid, E. Vinogradov, J. Li, H. C. Jarrell, S. M. Logan und J.-R. Brisson. „Structural characterization of surface glycans from *Clostridium difficile*“. *Carbohydr. Res.* 354 (2012), 65–73.
- [7] J. Peltier, P. Courtin, I. E. Meouche, L. Lemée, M.-P. Chapot-Chartier und J.-L. Pons. „*Clostridium difficile* Has an Original Peptidoglycan Structure with a High Level of N-Acetylglucosamine Deacetylation and Mainly 3-3 Cross-links“. *J. Biol. Chem.* 286.33 (2011), 29053–29062.
- [8] J. Ganeshapillai, E. Vinogradov, J. Rousseau, J. S. Weese und M. A. Monteiro. „*Clostridium difficile* cell-surface polysaccharides composed of pentaglycosyl and hexaglycosyl phosphate repeating units“. *Carbohydr. Res.* 343.4 (2008), 703–710.
- [9] D. Amador-Noguez, I. A. Brasg, X.-J. Feng, N. Roquet und J. D. Rabinowitz. „Metabolome Remodeling during the Acidogenic-Solventogenic Transition in *Clostridium acetobutylicum*“. *Appl. Environ. Microbiol.* 77.22 (2011), 7984–7997.
- [10] M. Dauner und U. Sauer. „Stoichiometric Growth Model for Riboflavin-Producing *Bacillus subtilis*“. *Biotechnol. Bioeng.* 76.2 (2001), 132–143.
- [11] M. Neumann-Schaal, J. D. Hofmann, S. E. Will und D. Schomburg. „Time-resolved amino acid uptake of *Clostridium difficile* 630 $\Delta$ *erm* and concomitant fermentation product and toxin formation“. *BMC Microbiol.* 15 (2015), 281.
- [12] C. Camacho, G. Coulouris, V. Avagyan, N. Ma, J. Papadopoulos, K. Bealer und T. L. Madden. „BLAST+: architecture and applications“. *BMC Bioinf.* 10 (2009), 421.
- [13] P. Jones, D. Binns, H.-Y. Chang, M. Fraser, W. Li *et al.* „InterProScan 5: genome-scale protein function classification“. *Bioinformatics* 30.9 (2014), 1236–1240.
- [14] B. Desguin, P. Goffin, E. Viaene, M. Kleerebezem, V. Martin-Diaconescu *et al.* „Lactate racemase is a nickel-dependent enzyme activated by a widespread maturation system“. *Nat. Commun.* 5.3615 (2014), 1–12.
- [15] M. Larocque, T. Chénard und R. Najmanovich. „A curated *C. difficile* strain 630 metabolic network: prediction of essential targets and inhibitors“. *BMC Syst. Biol.* 8.1 (2014), 117.
- [16] J. C. Rabinowitz und H. A. Barker. „Purine fermentation by *Clostridium cylindrosporium*. I. Tracer experiments on the fermentation of guanine“. *The J. Biol. Chem.* 218.1 (1956), 147–160.
- [17] J. C. Rabinowitz und H. A. Barker. „Purine fermentation by *Clostridium cylindrosporium*. II. Purine transformations“. *The J. Biol. Chem.* 218.1 (1956), 161–173.

- [18] J. C. Rabinowitz. „Purine fermentation by *Clostridium cylindrosporium*. III. 4-Amino-5-imidazolecarboxylic acid and 4-aminoimidazole“. *The J. Biol. Chem.* 218.1 (1956), 175–187.
- [19] J. C. Rabinowitz und W. E. Pricer. „Purine fermentation by *Clostridium cylindrosporium*. IV. 4-Ureido-5-imidazolecarboxylic acid“. *The J. Biol. Chem.* 218.1 (1956), 189–199.
- [20] W. E. Pricer und J. C. Rabinowitz. „Purine fermentation by *Clostridium cylindrosporium*. V. Formiminoglycine“. *The J. Biol. Chem.* 222.2 (1956), 537–554.
- [21] K. Freter, J. C. Rabinowitz und B. Witkop. „Labile Stoffwechselprodukte V. Zur Biogenese Des Formiminoglycins Aus 4(5H)-Imidazolon“. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 607.1 (1957), 174–187.
- [22] K. Uyeda und J. C. Rabinowitz. „Metabolism of Formiminoglycine. Glycine Formiminotransferase“. *The J. Biol. Chem.* 240 (1965), 1701–1710.
- [23] K. Uyeda und J. C. Rabinowitz. „Metabolism of Formiminoglycine. Formiminotetrahydrofolate Cyclodeaminase“. *The J. Biol. Chem.* 242.1 (1967), 24–31.
- [24] N. P. Curthoys und J. C. Rabinowitz. „Formyltetrahydrofolate Synthetase. Binding of Folate Substrates and Kinetics of the Reverse Reaction“. *The J. Biol. Chem.* 247.7 (1972), 1965–1971.
- [25] W. Jiang, J. Hermolin und R. H. Fillingame. „The preferred stoichiometry of c subunits in the rotary motor sector of *Escherichia coli* ATP synthase is 10“. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98.9 (2001), 4966–4971.
- [26] T. Murata, I. Yamato, Y. Kakinuma, A. G. W. Leslie und J. E. Walker. „Structure of the rotor of the V-Type Na<sup>+</sup>-ATPase from *Enterococcus hirae*“. *Science (New York, N.Y.)* 308.5722 (2005), 654–659.
- [27] P.-L. Tremblay, T. Zhang, S. A. Dar, C. Leang und D. R. Lovley. „The Rnf Complex of *Clostridium ljungdahlii* Is a Proton-Translocating Ferredoxin:NAD<sup>+</sup> Oxidoreductase Essential for Autotrophic Growth“. *mBio* 4.1 (2013), e00406–12.
- [28] V. Hess, K. Schuchmann und V. Müller. „The Ferredoxin:NAD<sup>+</sup> Oxidoreductase (Rnf) from the Acetogen *Acetobacterium woodii* Requires Na<sup>+</sup> and Is Reversibly Coupled to the Membrane Potential“. *J. Biol. Chem.* 288.44 (2013), 31496–31502.
- [29] R. C. Fahey, W. C. Brown, W. B. Adams und M. B. Worsham. „Occurrence of Glutathione in Bacteria.“ *J. Bacteriol.* 133.3 (1978), 1126–1129.
- [30] A. M. Spormann und R. K. Thauer. „Anaerobic acetate oxidation to CO<sub>2</sub> by *Desulfotomaculum acetoxidans*“. *Arch. Microbiol.* 150.4 (1988), 374–380.
- [31] R. Schauder, A. Preuß, M. Jetten und G. Fuchs. „Oxidative and reductive acetyl CoA/carbon monoxide dehydrogenase pathway in *Desulfobacterium autotrophicum*. 2. Demonstration of the enzymes of the pathway and comparison of CO dehydrogenase“. *Arch. Microbiol.* 151.1 (1988), 84–89.
- [32] M. Köpke, C. Held, S. Hujer, H. Liesegang, A. Wiezer *et al.* „*Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas“. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107.29 (2010), 13087–13092.
- [33] H. Nagarajan, M. Sahin, J. Nogales, H. Latif, D. R. Lovley, A. Ebrahim und K. Zengler. „Characterizing acetogenic metabolism using a genome-scale metabolic reconstruction of *Clostridium ljungdahlii*“. *Microb. Cell Fact.* 12 (2013), 118.
- [34] J. Mock, Y. Zheng, A. P. Mueller, S. Ly, L. Tran *et al.* „Energy Conservation Associated with Ethanol Formation from H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> in *Clostridium autoethanogenum* Involving Electron Bifurcation“. *J. Bacteriol.* 197.18 (2015), 2965–2980.

- [35] G. J. Schut und M. W. W. Adams. „The Iron-Hydrogenase of *Thermotoga maritima* Utilizes Ferredoxin and NADH Synergistically: a New Perspective on Anaerobic Hydrogen Production“. *J. Bacteriol.* 191.13 (2009), 4451–4457.
- [36] M. Calusinska, T. Happe, B. Joris und A. Wilmotte. „The surprising diversity of clostridial hydrogenases: a comparative genomic perspective“. *Microbiology* 156.6 (2010), 1575–1588.
- [37] J. Reith und C. Mayer. „Peptidoglycan turnover and recycling in Gram-positive bacteria“. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92.1 (2011), 1–11.
- [38] A. Faulds-Pain, S. M. Twine, E. Vinogradov, P. C. R. Strong, A. Dell *et al.* „The post-translational modification of the *Clostridium difficile* flagellin affects motility, cell surface properties and virulence“. *Mol. Microbiol.* 94.2 (2014), 272–289.
- [39] W. Kreis und C. Hession. „Isolation and Purification of L-Methionine- $\alpha$ -deamino- $\gamma$ -mercaptomethane-Lyase (L-Methioninase) from *Clostridium sporogenes*“. *Cancer Res.* 33.8 (1973), 1862–1865.
- [40] M. Musfeldt und P. Schönheit. „Novel Type of ADP-Forming Acetyl Coenzyme A Synthetase in Hyperthermophilic *Archaea*: Heterologous Expression and Characterization of Isoenzymes from the Sulfate Reducer *Archaeoglobus fulgidus* and the Methanogen *Methanococcus jannaschii*“. *J. Bacteriol.* 184.3 (2002), 636–644.
- [41] E.-H. Aboulmaga, O. Pinkenburg, J. Schiffels, A. El-Refai, W. Buckel und T. Selmer. „Butyrate production in *Escherichia coli*: Exploitation of an oxygen tolerant bifurcating butyryl-CoA dehydrogenase/electron transferring flavoprotein complex from *Clostridium difficile*“. *J. Bacteriol.* (2013), JB.00321–13.
- [42] B. Han, V. Gopalan und T. C. Ezeji. „Acetone production in solventogenic *Clostridium* species: new insights from non-enzymatic decarboxylation of acetoacetate“. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91.3 (2011), 565–576.
- [43] E. Meyer, N. J. Leonard, B. Bhat, J. Stubbe und J. M. Smith. „Purification and Characterization of the *purE*, *purK*, and *purC* Gene Products: Identification of a Previously Unrecognized Energy Requirement in the Purine Biosynthetic Pathway“. *Biochemistry* 31.21 (1992), 5022–5032.
- [44] W. M. Patrick, E. M. Quandt, D. B. Swartzlander und I. Matsumura. „Multicopy Suppression Underpins Metabolic Evolvability“. *Mol. Biol. Evol.* 24.12 (2007), 2716–2722.
- [45] A. M. Brown, S. L. Hoopes, R. H. White und C. A. Sarisky. „Purine biosynthesis in archaea: variations on a theme“. *Biology Direct* 6.1 (2011), 63.
- [46] S. J. Moore, R. Biedendieck, A. D. Lawrence, E. Deery, M. J. Howard, S. E. J. Rigby und M. J. Warren. „Characterization of the Enzyme CbiH<sub>60</sub> Involved in Anaerobic Ring Contraction of the Cobalamin (Vitamin B<sub>12</sub>) Biosynthetic Pathway“. *The J. Biol. Chem.* 288.1 (2013), 297–305.
- [47] P. Burguière, S. Auger, M.-F. Hullo, A. Danchin und I. Martin-Verstraete. „Three Different Systems Participate in L-Cystine Uptake in *Bacillus subtilis*“. *J. Bacteriol.* 186.15 (2004), 4875–4884.
- [48] A. C. Pitts, L. R. Tuck, A. Faulds-Pain, R. J. Lewis und J. Marles-Wright. „Structural Insight into the *Clostridium difficile* Ethanolamine Utilisation Microcompartment“. *PLoS ONE* 7.10 (2012), e48360.
- [49] T. Midtvedt und A. Norman. „Bile Acid Transformations by Microbial Strains Belonging to Genera Found in Intestinal Contents“. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 71.4 (1967), 629–638.
- [50] C. N. Falany, H. Fortinberry, E. H. Leiter und S. Barnes. „Cloning, expression, and chromosomal localization of mouse liver bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase“. *J. Lipid Res.* 38.6 (1997), 1139–1148.